



Etude biochimique et fonctionnelle de la protéine PerR de *Bacillus subtilis* : un senseur bactérien du peroxyde d'hydrogène

Abdelnasser El Ghazouani

► To cite this version:

Abdelnasser El Ghazouani. Etude biochimique et fonctionnelle de la protéine PerR de *Bacillus subtilis* : un senseur bactérien du peroxyde d'hydrogène. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00259140

HAL Id: tel-00259140

<https://theses.hal.science/tel-00259140>

Submitted on 26 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Chimie-Biologie

Présentée par

Abdelnasser El Ghazouani

**Etude biochimique et fonctionnelle de la protéine
PerR de *Bacillus subtilis* : un senseur bactérien du
peroxyde d'hydrogène**

Soutenue le 13 novembre 2007

Jury :

Dr. Marius Réglie	rapporteur
Dr. Michel Toledano	rapporteur
Pr. Alain Favier	examineur
Dr. Jean-Luc Boucher	examineur
Dr. Victor Duarte	co-directeur de thèse
Dr. Jean-Marc Latour	directeur de thèse

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Chimie et de Biologie des Métaux
UMR 5249 - CEA Grenoble

Remerciements

Ce travail a débuté au sein du Laboratoire de Physico-chimie des Métaux en Biologie pour se terminer après fusion de plusieurs laboratoires au sein du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux du CEA Grenoble. Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Marc Latour de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir soutenu tout au long de mes années au laboratoire.

Mes remerciements vont ensuite à Victor Duarte qui m'a « tout simplement » appris à « faire de la recherche » en me guidant par ses précieux conseils et son aide toujours constante. Je le remercie sincèrement pour tous les efforts qu'il a fournis pour que ce travail aboutisse.

Je remercie les membres de mon jury ; Michel Toledano et Marius Réglier d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, Jean-Luc Boucher d'avoir été mon examinateur et Alain Favier d'avoir accepté d'être le président du jury.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé à l'aboutissement de ce travail :

- *au PMB ; Daouda Traoré, Christelle Caux-Thang, Arahmatoulaye Maïga, Geneviève Blondin, Sougandi Ilango, Sabine Etienne, Olivier Sénèque, Patrick Dubourdeaux, Eric Gouré*
- *pour les études en cristallographie, Lilian Jacquamet (paix à son âme), Jérôme Dupuy et Jean-Luc Ferrer*
- *pour les études en spectrométrie de masse, Christine Saint-Pierre, David Lascoux et David Lemaire*
- *pour l'étude en dichroïsme circulaire, Vincent Forge*
- *pour les synthèses d'oligonucléotides modifiés, Didier Gasparutto*
- *pour l'étude de la 2-oxo-histidine, Jean-Luc Ravanat*
- *pour l'analyse en métaux de la protéine, Josiane Arnaud.*

Un remerciement spécial à l'attention de Caroline Fauquant avec qui j'ai partagé ces trois années. Partager avec moi ton bureau n'a pas dû être chose facile tous les jours et rien

que pour ça on devrait te décerner un titre spécial, encore merci à toi. Je tiens également à remercier chaleureusement Isabelle Michaud-Soret pour ses nombreux conseils, son soutien et son amitié. Merci aussi à Sylvia Vitale à qui je souhaite de réussir sa thèse du mieux possible. Je remercie une nouvelle fois Daouda Traoré mais cette fois-ci pour son amitié, « Get on down ! »...

Je tiens également à remercier tous mes amis (du nord comme du sud, les anciens comme les nouveaux pour n'oublier personne...) pour m'avoir supporté et encouragé à aller de l'avant pendant ces trois années.

Enfin, je dédie ce manuscrit de thèse à toute ma famille et plus particulièrement à ma mère, qui m'a toujours aidé, soutenu et encouragé tout au long de mes études.

Sommaire

Sommaire	7-11
Liste des abréviations	13-14
<u>Introduction</u>	15-80
I. Le stress oxydant.	17
1) <i>Définition des espèces réactives de l'oxygène</i>	17
2) <i>Source des ERO</i>	18
3) <i>Réactivités</i>	19
a. les cibles du radical superoxyde	19
b. les cibles du peroxyde d'hydrogène	20
c. Les cibles du radical hydroxyle	21
4) <i>Régulation d'H₂O₂ et le rôle bénéfique des ERO</i>	21
II. Les systèmes enzymatiques de défense aux ERO.	23
1) <i>Description des activités induites ou réprimées</i>	23
2) <i>Les enzymes anti-oxydantes</i>	24
a. Les superoxyde-dismutases (SOD)	24
b. Les superoxyde réductases (SOR)	26
c. Les catalases	29
d. Les peroxydases à thiol	30
III. Caractérisation des mécanismes moléculaires de détection des peroxydes.	37
A. <u>Le système « détecteur-régulateur » OxyR chez <i>E.coli</i>.</u>	37
1) <i>OxyR en tant qu'interrupteur « on-off »</i>	38
2) <i>Activation par formation d'un pont disulfure intramoléculaire</i>	39
a. Les premiers travaux	39
b. Mise en évidence du pont disulfure	40

c. Bases structurales de la réactivité	41
3) <i>Un mécanisme d'activation controversé</i>	42
4) <i>Conclusion</i>	43
B. <u>Le relais Orp1-Yap1 chez <i>S. cerevisiae</i>.</u>	43
1) <i>L'activité de Yap1 dépend de sa localisation subcellulaire</i>	44
2) <i>Les premières données structurales</i>	45
3) <i>Orp1 est le véritable senseur d'H₂O₂</i>	46
4) <i>H₂O₂ n'est pas le seul activateur de Yap1</i>	48
5) <i>Conclusion</i>	48
C. <u>La réponse aux peroxydes chez <i>Bacillus subtilis</i>.</u>	49
1) <i>Le facteur σ^B</i>	49
2) <i>Le facteur OhrR</i>	50
a. Deux modes d'activation	50
b. Les données structurales	52
3) <i>Le facteur PerR</i>	54
a. PerR existe sous deux formes	55
b. Les gènes régulés par PerR	55
c. Mode d'action	55
d. Les premières hypothèses du mécanisme d'oxydation	56
e. Réaction d'oxydation centrée sur le métal de régulation	57
f. PerR est présent chez de nombreux organismes	59
IV. Oxydation d'acides aminés catalysée par un métal.	60
1) <i>Une réactivité sélective et localisée</i>	60
2) <i>Un mécanisme d'oxydation encore mal défini</i>	62
3) <i>Le mécanisme d'activation de PerR</i>	64
4) <i>Exemples de protéines à fer non héminique</i>	64

<u>Résultats</u>	83-206
<u>Chapitre I : Purification et caractérisation de PerR de <i>Bacillus subtilis</i>.</u>	85-115
I. Protocole de purification de PerR.	87
1) <i>Obtention des extraits protéiques</i>	87
2) <i>Purification par chromatographie d'affinité</i>	88
3) <i>Purification par filtration sur gel</i>	89
4) <i>Détermination du coefficient d'extinction molaire de PerR</i>	90
5) <i>Contenu en métal de la protéine</i>	91
II. Caractérisation en spectrométrie de masse.	91
1) <i>Description des techniques utilisées</i>	91
2) <i>Protéine entière</i>	93
3) <i>Digestion tryptique</i>	94
III. Métallation de PerR par l'ion Mn^{2+}.	97
1) <i>RPE de l'ion Mn^{2+}</i>	97
2) <i>Dosage du site métallique</i>	99
IV. Modifications apportées au protocole initial.	103
V. Affinité de la protéine pour le Mn^{2+}.	106
1) <i>Principe</i>	106
2) <i>Affinité de l'ion Mn^{2+} pour la protéine PerR</i>	108
VI. Affinité de la protéine pour l'ADN.	110
1) <i>Principe</i>	110
2) <i>Interaction ADN/PerR</i>	111
3) <i>Affinité de la protéine pour l'ADN</i>	112

VII. Conclusion.	113
<u>Chapitre II : Structure cristallographique de PerR-Zn et étude du site à zinc.</u>	117-141
I. Structure cristallographique de la forme apo PerR-Zn.	119
II. Résumé de l'article paru dans Molecular Microbiology.	122
III. Discussion.	133
<u>Chapitre III : Vers une forme active de la protéine.</u>	143-165
I. Un modèle pour la forme active.	145
1) <i>Comparaison dans les banques de données structurales</i>	<i>145</i>
2) <i>La structure cristallographique de la protéine Fur de P. aeruginosa</i>	<i>146</i>
3) <i>Hypothèse pour la forme active de PerR</i>	<i>148</i>
4) <i>Un site potentiel de régulation</i>	<i>149</i>
II. Démarche expérimentale.	150
1) <i>Principe de la spectroscopie de fluorescence des protéines</i>	<i>150</i>
2) <i>Exemple de la protéine OxyR</i>	<i>152</i>
3) <i>Synthèse des mutants PerR-Y44W et PerR-Y77W</i>	<i>153</i>
4) <i>Vérification des structures secondaires et tertiaires des mutants</i>	<i>154</i>
III. Résultats.	156
1) <i>Mutant PerR-Y44W</i>	<i>157</i>
2) <i>Mutant PerR-Y77W</i>	<i>158</i>
IV. Conclusion et discussion.	162
<u>Chapitre IV : Interaction ADN-PerR.</u>	167-192

I. Réalisation d'un adduit covalent ADN-PerR.	171
1) <i>Principe</i>	171
2) <i>Affinité de PerR pour les différentes séquences oligonucléotidiques</i>	173
3) <i>Réactivité en présence de sels d'iridium</i>	176
4) <i>Réaction de pontage covalent ADN-protéine</i>	177
II. Mutagenèse dirigée.	180
1) <i>Principe</i>	180
2) <i>Etude de l'interaction des mutants de PerR avec l'ADN</i>	182
III. Conclusion.	184
IV. Discussion.	185
1) <i>La stœchiométrie du complexe ADN-PerR</i>	185
2) <i>La spécificité de reconnaissance ADN-PerR</i>	188
 <u>Chapitre V : La 2-oxo-histidine, marqueur de l'oxydation de PerR.</u>	 193-206
I. Synthèse et détection de la 2-oxo-histidine.	196
1) <i>Synthèse d'une solution calibrée de 2-oxo-histidine</i>	196
2) <i>Détection et quantification de la 2-oxo-histidine par HPLC-MS/MS</i>	198
II. Dosage de la 2-oxo-histidine dans différents lots de protéine oxydée.	201
III. Conclusion et discussion.	203
 <u>Conclusion Générale</u>	 207-215
<u>Matériels et Méthodes</u>	217-230

Liste des abréviations :

ADN	acide désoxyribonucléique
AMS	acide 4-acétamido-4'-maleimidylstilbène-2,2'-disulfonique
ARN	acide ribonucléique
BSA	Bovine Serum Albumine
CD	dichroïsme circulaire
Da	dalton
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DTNB	acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque
DTT	Dithiothréitol
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
EMSA	ElectroMobility Shift Assay
eq	équivalent
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ESI	Electrospray Ionisation
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -thio-galactopyranoside
K _d	constante de dissociation
LB	Luria Bertani
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MCO	Metal Catalyzed Oxidation
MCPBA	acide m-chloroperoxybenzoïque
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
ENH	Electrode Normale à Hydrogène
PAGE	Protein Analysis Gel Electrophoresis
PAR	4-(2-pyridylazo)résorcinol
PCR	Polymerase Chain reaction
PhIO	iodosylbenzene

Q-TOF	Quadrupole-Time Of Flight
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SDS	Sodium Dodécylsulfate
TFA	acide trifluoroacétique
TOF	Time Of Flight
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	Ultra Violet
XANES	X-ray Absorption Near Edge Structure

Introduction

I. Le stress oxydant.

Le stress oxydant peut être défini fonctionnellement comme un excès d'espèces oxydantes au sein de la cellule (Storz & Imlay, 1999) : ce sont essentiellement les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces espèces peuvent endommager l'ADN, les protéines et les lipides (Storz & Imlay, 1999). Cet excès peut être dû soit à une surproduction d'ERO soit à une carence au niveau des systèmes de défense.

Nous définirons dans ce premier chapitre ces ERO : leur formation ainsi que leurs conséquences pour la cellule.

1) Définition des espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) résultent de réductions mono-électroniques successives du dioxygène (O_2) aboutissant à la formation d'eau (Figure I.1 ; (Farr & Kogoma, 1991)).

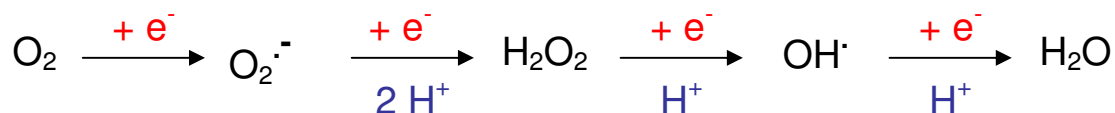


Figure I.1 : les ERO représentent les différents états de réduction du dioxygène.

De par sa configuration électronique, le dioxygène est avide d'électron (c'est-à-dire qu'il revêt un caractère oxydant). Cependant, un blocage cinétique, dû à son caractère radicalaire, limite sa réactivité sinon nous nous enflammerions à l'air... Sa structure électronique permet aussi d'expliquer sa faible réactivité. En effet, bien qu'il possède un nombre pair d'électrons, il présente deux électrons non appariés au niveau de ses orbitales moléculaires (Figure I.2). Ces deux électrons présentent le même nombre quantique de spin (spins parallèles). Pour que le dioxygène oxyde des molécules en acceptant une paire d'électrons, il faudrait que ces électrons soient également de spin parallèle pour pouvoir s'apparier avec les électrons libres de O_2 , ce qui n'est généralement pas le cas. Cette « restriction de spin » impose donc une restriction du pouvoir oxydant de O_2 .

De ce fait, le dioxygène est « contraint » à des réactions de transfert d'un seul électron à la fois, ce qui conduit, par ordre de réduction, à la formation du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$),

du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle (OH^\bullet) (Figure I.1). Il existe également d'autres espèces réactives telles que l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), l'ozone (O_3), l'acide hypochlorique (HOCl) ou les dérivés azotés (oxyde nitrique NO^\bullet , peroxydinitrite NO_3^\bullet ...) mais elles ne seront pas abordées ici.

Le radical superoxyde est essentiellement produit pendant le cycle de la respiration ou lors de l'activation des macrophages au cours de la réponse immunitaire. Sa dismutation (catalysée au sein de la cellule) conduit à la production de peroxyde d'hydrogène. Celui-ci peut alors réagir avec des métaux de transition entraînant la formation du radical hydroxyle (réaction de type Fenton (Fridovich, 1978)).

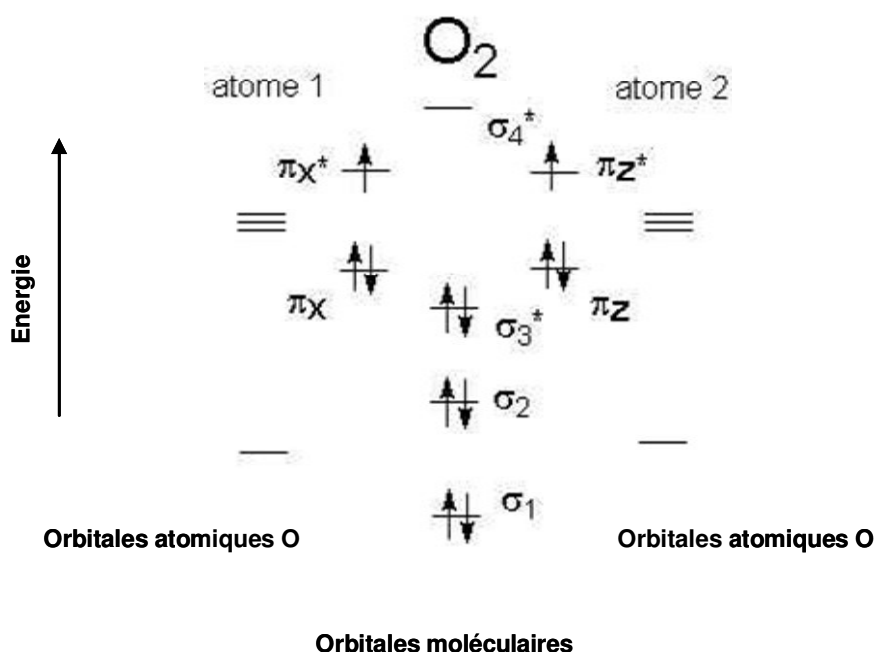


Figure I.2 : diagramme d'énergie des orbitales moléculaires du dioxygène.

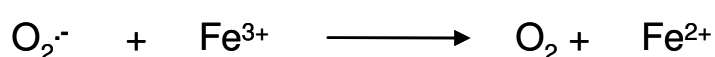
2) Source des ERO

Le métabolisme normal de la cellule produit sans cesse des espèces réactives de l'oxygène (Chance *et al.*, 1979 ; Storz & Imlay, 1999). En effet, les systèmes utilisant un transfert d'électrons (normalement étroitement contrôlés) sont parfois le lieu de « fuites électroniques ». Par conséquent, la chaîne respiratoire (Fridovich, 1978), les oxydases (xanthine, NADPH...), les réductases sont responsables d'une génération permanente d'ERO.

Imlay et Fridovich ont montré, en 1991, que la plus importante source de $O_2^{\cdot -}$ *in vivo* était très probablement la chaîne de transport des électrons présente chez les cellules aérobies (Imlay & Fridovich, 1991). Des études récentes ont permis de mettre en évidence plus précisément les enzymes « responsables » de leur formation : la fumarate réductase (Messner & Imlay, 2002) (dans le cas particulier du passage d'un milieu anaérobie vers un milieu aérobie), la NADH déhydrogénase II et la sulfite réductase (Messner & Imlay, 1999). Pour chacune de ces enzymes, l'oxydation se fait au niveau de leur cofacteur : la flavine. Le fort pouvoir réducteur de cette flavine (lorsqu'elle est oxydée, il y a formation d'une semi-quinone très stable) permet en effet de franchir la barrière thermodynamique de réduction mono-électronique de O_2 ($E^\circ (O_2/O_2^{\cdot -}) = -0,33V$).

Dans les conditions physiologiques, l'ion superoxyde est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène par dismutation. Cette réaction peut être spontanée mais elle est le plus souvent catalysée par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD ; (Fridovich, 1978). Gonzalez-Flecha et Demple ont montré que 87% du peroxyde d'hydrogène intracellulaire est formé au niveau de la chaîne respiratoire (Gonzalez-Flecha & Demple, 1995). Parallèlement, $O_2^{\cdot -}$ et H_2O_2 participent à la production du radical hydroxyle, via les réactions d'Haber-Weiss (Goldstein & Czapski, 1983) et de Fenton (Figure I.3 ; (Rush & Bielski, 1985). Les productions d'ERO sont donc fortement liées entre elles.

Réaction d'Haber-Weiss:



Réaction de Fenton:



Figure I.3 : le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène participent à la formation de radical hydroxyle ; le fer peut être remplacé par le cuivre (Fe^{3+}/Fe^{2+} par Cu^{2+}/Cu^{+}).

3) Réactivités

a. les cibles du radical superoxyde :

L'action de $O_2^{\cdot-}$ sur les centres Fer-Soufre est en grande partie responsable de sa toxicité. Il détruit ces clusters par oxydation du Fe(II) en Fe(III) (Fridovich, 1997) entraînant l'inactivation des enzymes à centre Fer-Soufre (dont certaines sont essentielles au métabolisme cellulaire) et le relargage massif de fer dans la cellule aboutissant à des dommages sur l'ADN (Imlay, 2003). Mais $O_2^{\cdot-}$ peut également agir en tant que réducteur de métaux de transition au cours de la réaction d'Haber-Weiss (Figure I.3). Cette réduction peut même avoir lieu lorsque le métal se trouve complexé au sein d'une protéine comme c'est le cas, par exemple, pour le cytochrome c (Fe^{3+}) qui peut être réduit en cytochrome c (Fe^{2+}) (McCord & Fridovich, 1988).

L'anion superoxyde se dismute spontanément en O_2 et H_2O_2 , mais dans les conditions physiologiques, la vitesse de cette réaction bimoléculaire est faible et le temps de vie du superoxyde est suffisamment long pour qu'il puisse soit oxyder des composants des macromolécules biologiques (ADN, protéines...), soit générer d'autres espèces réactives oxygénées bien plus toxiques que le superoxyde lui-même (telles que le peroxynitrite en réagissant avec NO ou le radical hydroxyle en réagissant avec H_2O_2).

Pour éviter la toxicité du superoxyde et de ses dérivés, l'évolution a permis d'obtenir des superoxyde dismutases (SOD) hautement efficaces (Fridovich, 1989). La Cu-Zn SOD a la plus grande constante de vitesse catalytique connue pour une enzyme ($k_{cat} = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). La réaction entre cette enzyme et le superoxyde n'est limitée que par la diffusion du superoxyde vers le site actif de l'enzyme. Dans les conditions normales, la SOD réduit efficacement la concentration de superoxyde dans les tissus vivants, empêchant la toxicité du superoxyde de se manifester.

b. les cibles du peroxyde d'hydrogène :

Bien que H_2O_2 soit capable d'inhiber la croissance cellulaire, les mécanismes réactionnels mis en jeu sont à ce jour peu connus. On sait, néanmoins, qu'il présente une réactivité spécifique vis-à-vis de certains résidus cystéines et méthionines des protéines. L'oxydation d'une cystéine par H_2O_2 entraîne la formation d'un acide sulfénique (R-SOH). Cette espèce peut ensuite réagir avec une autre cystéine pour former un pont disulfure ou s'oxyder en acide sulfonique (R-SO₂H) ou sulfinique (R-SO₃H).

Il était communément admis que seules les oxydations en acide sulfénique ou en pont disulfure étaient réversibles (ces formes pouvant être réduites par différentes thiol-réductases spécifiques) mais très récemment, Biteau et al. (Biteau *et al.*, 2003) ont montré que l'oxydation en acide sulfinique du thiol responsable de l'activité catalytique des peroxyrédoxines (Tsa1 chez *Streptomyces cerevisiae*) était réversible grâce à la sulfirédoxine (ce point sera abordé plus en détail dans la deuxième partie de cette introduction). Cependant il semble que ce phénomène soit spécifique aux peroxyrédoxines et que la formation d'un acide sulfinique reste largement irréversible (Woo *et al.*, 2005). L'oxydation d'une méthionine conduit à la formation de méthionine sulfoxyde dont la réduction est catalysée par une enzyme spécifique, la méthionine sulfoxyde réductase (Brot *et al.*, 1981).

c. Les cibles du radical hydroxyle :

La dernière espèce formée au cours de la réduction du dioxygène en eau après $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 est le radical hydroxyle qui est aussi produit par la réaction de Fenton (Figure I.3). Des trois formes réduites de l'oxygène, OH^{\cdot} est sans nul doute l'espèce la plus réactive et le principal responsable des dommages cellulaires. Cette réactivité est telle que, contrairement aux deux espèces précédentes, le radical hydroxyle n'a pas le temps de diffuser avant de réagir (Pryor, 1986). L'ADN représente une cible privilégiée d' OH^{\cdot} , ceci s'explique par la réaction d' H_2O_2 avec le Fe(II) présent au niveau des groupements phosphodiester des acides nucléiques (Henle & Linn, 1997). Un grand nombre de lésions peut alors être formé. OH^{\cdot} réagit avec l'ensemble des composants cellulaires selon trois types de réactivité ;

- par réaction d'addition entraînant par exemple l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques ainsi que certains acides aminés aromatiques tels que les histidines
- il peut arracher un hydrogène
- il peut aussi transférer son électron non apparié entraînant ainsi la formation de nouvelles espèces radicalaires. Ce phénomène est impliqué dans l'initiation des réactions en chaîne responsables de la peroxydation lipidique.

4) Régulation d' H_2O_2 et le rôle bénéfique des ERO

In vivo, l'exposition des cellules aux ERO, et en particulier au peroxyde d'hydrogène, peut, à de faibles doses, inhiber leur croissance et à des doses plus élevées entraîner leur mort. En phase exponentielle de croissance, la production de radical superoxyde par le métabolisme respiratoire est estimée à environ $4 \cdot 10^{-6}$ M/s chez *E. coli* (Imlay & Fridovich, 1991) dont une partie conduit à la production de H_2O_2 (Gonzalez-Flecha & Demple, 1995). Cependant, les concentrations intracellulaires en $O_2^{\cdot-}$ et en H_2O_2 sont respectivement de 10^{-10} M et 10^{-7} M. De plus, malgré une augmentation de plus de 10 fois de la production de H_2O_2 au cours de la phase exponentielle, sa concentration intracellulaire n'est multipliée que par deux (entre 0,13 et 0,25 μ M) (Gonzalez-Flecha & Demple, 1997). La concentration en peroxyde d'hydrogène est donc finement régulée et, par ailleurs, elle n'est pas nulle ce qui suggère un équilibre entre la production et la consommation d' H_2O_2 .

Il est aujourd'hui reconnu que les ERO (et en particulier H_2O_2) jouent un rôle essentiel dans l'activation de différents mécanismes cellulaires en modifiant le potentiel redox de la cellule (Finkel, 2003 ; Scandalios, 2002). $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 se comportent alors comme de petites molécules de signalisation intracellulaire (Finkel, 2000). De nombreuses interactions protéine-protéine et ADN-protéine sont régulées par l'état redox de leurs cystéines. Ces fonctions thiols peuvent, en effet, être oxydées par les ERO entraînant ainsi l'activation de facteurs de transcription. C'est le cas, par exemple, de NF- κ B et AP1 qui sont impliqués dans les phénomènes de prolifération cellulaire et de différenciation (Bolwell & Wojtaszek, 1997).

Le paradoxe de l'oxygène réside dans le paradoxe de l'évolution elle-même. L'évolution a réussi à tirer le meilleur parti de cette situation en mettant en place d'une part des systèmes de défense (enzymatiques ou non) pour contrer les effets toxiques des espèces réactives de l'oxygène générées lors de la respiration cellulaire et d'autre part en utilisant ces ERO à des fins utiles comme nous venons de le voir précédemment.

Les deux parties qui suivent sont consacrées à l'étude des mécanismes enzymatiques de défense permettant à la cellule de dégrader ces ERO puis à l'analyse des systèmes de détection des peroxydes.

II. Les systèmes enzymatiques de défense aux ERO.

Des modifications de l'environnement ou du métabolisme cellulaire peuvent induire un état de stress oxydant. La survie de la cellule dépend de sa capacité à répondre à ce stress ce qui laisse supposer la présence d'un système de détection capable de détecter la variation d'un paramètre donné, puis de transmettre cette modification à un système effecteur qui va tenter de corriger cette perturbation. Cette réponse est une réponse adaptative (Christman *et al.*, 1985; Demple & Halbrook, 1983; Dowds *et al.*, 1987; Murphy *et al.*, 1987), c'est-à-dire que la cellule est plus résistante face à un stress lorsque elle a été auparavant exposée au même stress mais d'une amplitude plus faible. Ce type de réponse confirme la présence de systèmes détecteurs et effecteurs spécifiques.

Dans cette partie, nous décrivons les différents systèmes enzymatiques de dégradation induits en réponse aux espèces réactives de l'oxygène avant de définir dans le troisième chapitre les systèmes de détection qui les régulent.

1) Description des activités induites ou réprimées

L'analyse de gels d'électrophorèse à deux dimensions, et plus récemment, l'utilisation des puces à ADN, ont permis de caractériser l'ensemble des activités induites ou réprimées lors d'une situation de stress oxydant (induit par $O_2^{\cdot-}$ ou H_2O_2) et de dégager un certain nombre de traits caractéristiques chez la bactérie *E. coli* (Pomposiello *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001a). Dans ce sens, la cellule induit la synthèse de protéines anti-oxydantes, de choc thermique, de réparation de l'ADN et de pompes à efflux permettant l'élimination des toxiques.

Dans la suite de cette partie, nous détaillerons les protéines anti-oxydantes, présentes chez différents organismes, parmi lesquelles on trouve les superoxyde dismutases, les superoxyde réductases, les catalases, les peroxydases, les enzymes de la voie des thiorédoxines et le glutathion.

2) Les enzymes anti-oxydantes

Ces protéines sont essentielles au maintien de l'homéostasie redox car elles catalysent l'élimination des ERO par réduction. On distingue deux grands modes de catalyse :

- Grâce aux propriétés redox des métaux, les superoxyde-dismutases et les catalases réalisent respectivement la dismutation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en dioxygène et la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène. Leur activité réductrice est indépendante du pouvoir réducteur du NADPH (ou NADH).
- Les peroxydases catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et des peroxydes organiques en alcool grâce au pouvoir réducteur du NADPH (ou NADH).

a. Les superoxyde-dismutases (SOD) :

i) Quatre types de SOD

Elles ont été isolées et caractérisées chez une grande variété d'organismes. La première SOD a été mise en évidence par McCord et Fridovich en 1969 (McCord & Fridovich, 1969a; McCord & Fridovich, 1969b). Ces enzymes catalysent la conversion de deux molécules d' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 (Figure II.1) par un mécanisme de dismutation métal-dépendant (Scandalios, 2005). Cette réaction s'effectue en deux étapes : dans un premier temps, le métal de transition, présent au sein du site actif, est réduit par une première molécule d' $O_2^{\cdot-}$ libérant O_2 et ensuite sa ré-oxydation par une deuxième molécule d' $O_2^{\cdot-}$ permet sa régénération et la libération d'une molécule d' H_2O_2 (Figure II.2).



Figure II.1 : réduction de l'anion superoxyde par la superoxyde dismutase.

Il existe quatre classes de SOD en fonction du métal de transition présent dans le site actif mais la plupart des organismes n'en possèdent qu'une seule (Scandalios, 2005). Elles sont sous forme de monomère, de dimère ou de tétramère :

- les SOD fer-dépendantes (FeSOD).
- les SOD manganèse-dépendantes (MnSOD ; (Weisiger & Fridovich, 1973).
- les SOD cuivre-dépendantes (Cu/ZnSOD ; (Crapo *et al.*, 1992).
- les SOD nickel-dépendantes (NiSOD ; (Youn *et al.*, 1996).

ii) La première ligne de défense

L'importance de ces enzymes a été mise en évidence par l'étude phénotypique de mutants déficients en activité SOD chez les bactéries (Farr *et al.*, 1986; Purdy & Park, 1994), la levure (Chang & Kosman, 1990; Gralla & Valentine, 1991) et même chez la souris (Lebovitz *et al.*, 1996). Son absence entraîne un défaut de croissance, diverses auxotrophies, une hypersensibilité à l'oxygène et aux composés générateurs d'ions superoxyde (tel que le paraquat) ainsi qu'une augmentation du nombre de mutations spontanées. Une partie de ces phénotypes résulte de l'inactivation par l'ion superoxyde des protéines à centre fer-soufre dont certaines participent aux voies de biosynthèse des acides aminés (Culotta, 2000). L'augmentation du taux de mutations pourrait s'expliquer par la destruction des centres fer-soufre entraînant la libération de fer et donc une augmentation de sa concentration intracellulaire (Keyer & Imlay, 1996); le fer ainsi libéré pourrait alors participer aux réactions de Fenton et d'Haber-Weiss conduisant à la production du radical hydroxyle particulièrement mutagène.

La réduction spontanée de $O_2^{\cdot-}$ est très défavorable, ceci s'explique notamment par la répulsion à pH neutre entre deux molécules de $O_2^{\cdot-}$. L'enzyme réalise cette réduction en deux étapes (Figure II.2) :

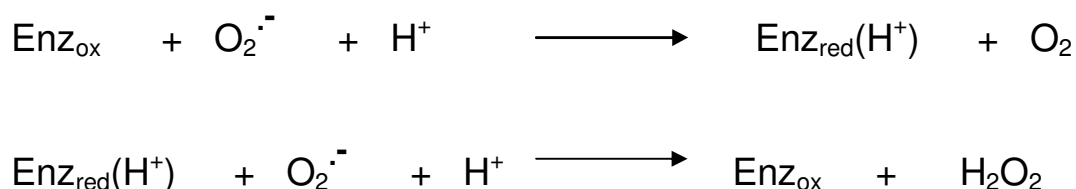


Figure II.2 : réduction en deux étapes, Enz_{ox} et Enz_{red} correspondent respectivement aux états $\text{Cu}^{2+}\text{Zn}^{2+}$ et $\text{Cu}^+\text{Zn}^{2+}$, Fe^{3+} et Fe^{2+} , Mn^{3+} et Mn^{2+} , Ni^{3+} et Ni^{2+} des SOD Cu/Zn, Fe, Mn et Ni.

Lors de la première étape, l'enzyme accélère fortement la réduction de l'ion superoxyde en fournissant un proton ; l'énergie libérée est alors utilisée pour la seconde étape. De plus, la SOD réagit avec une molécule d'O₂^{•-} à la fois ce qui permet de s'affranchir du problème de répulsion et elle exploite les interactions électrostatiques avec la charge négative de l'ion superoxyde pour favoriser une fixation spécifique du substrat mais pas des produits formés qui eux sont neutres (Miller, 2004).

b. Les superoxyde-réductases (SOR) :

Jusqu'à très récemment, la seule enzyme connue pour éliminer le radical superoxyde était la superoxyde dismutase (SOD), mais des études récentes ont montré que certaines bactéries (*Desulfovibrio baarsi*, *Archeoglobus fulgidus*, *Treponema pallidum* par exemple) sont dotées d'un autre système enzymatique permettant l'élimination du superoxyde. Il s'agit de la superoxyde réductase (SOR) (Lombard *et al.*, 2000a; Niviere & Fontecave, 2004) qui, comme son nom l'indique, élimine le superoxyde par réduction (Figure II.3).



Figure II.3 : réduction de l'anion superoxyde par la superoxyde réductase.

La SOR est une petite métalloprotéine qui contient un atome de fer au niveau de son site actif. Celui-ci est situé en surface et est facilement accessible au solvant. Il présente une géométrie pyramidale à base carrée. Le fer ferreux haut spin est lié à quatre atomes d'azote d'histidine en position équatoriale et à un atome de soufre d'une cystéine en position axiale (Figure II.4). La 6^{ème} position de coordination du Fe²⁺ est vacante ce qui suggère que l'anion superoxyde viendrait se fixer à ce niveau ce qui indique un mécanisme d'oxydation de type sphère interne. Après réaction et donc passage à la forme oxydée Fe³⁺, un changement de conformation se produirait à proximité de deux résidus conservés (lysine et glutamate proches du 6^{ème} site de coordination). La lysine s'écarterait tandis que le glutamate deviendrait le 6^{ème} ligand du Fe³⁺ haut spin (Yeh *et al.*, 2000)

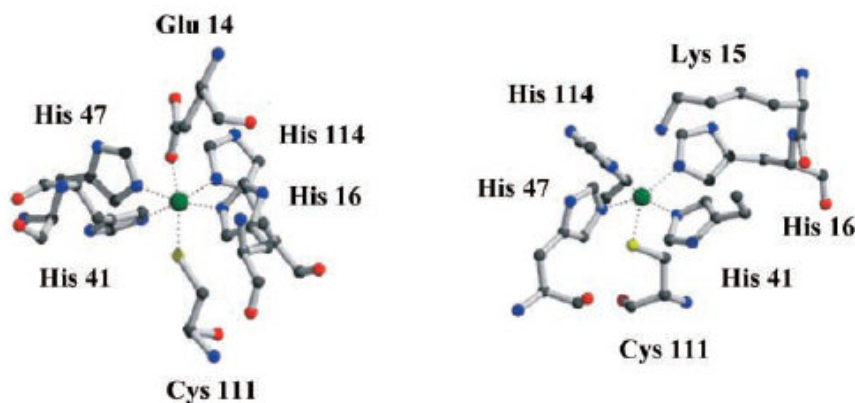


Figure II.4 : représentation des structures cristallographiques du site actif oxydé (à gauche) et réduit (à droite) de la SOR de *P. furiosus* (Yeh *et al.*, 2000).

i) Trois classes de SOR

Les superoxyde réductases présentent toutes un domaine C-terminal avec une forte homologie de séquence. Ce domaine renferme le site actif. Elles diffèrent entre elles par la présence ou non d'un domaine N-terminal pouvant renfermer un second site à fer de type desulfofodoxine.

Les SOR de classe 1 (*Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris*...) s'organisent en structure homodimère ; les deux domaines d'un monomère renferment chacun un centre mono-nucléaire à fer non hémique. Le site actif contient le fer ferreux stable à l'air, il est appelé centre II. Un second site à fer, appelé centre I, dont le rôle reste à définir est également présent ; le fer sous forme ferrique y est coordonné par quatre soufres de cystéinates (Adam *et al.*, 2004).

Parmi les SOR de classe 2, seule celle de *Treponema pallidum* a été étudiée. Elle présente également une forme homodimère mais le fer présent dans le site actif s'oxyde facilement à l'air (Lombard *et al.*, 2000b). L'absence de trois des quatre cystéines liant le fer explique l'absence de centre I chez cette classe de SOR.

Les SOR de classe 3 présentent de fortes homologies de séquence avec les domaines C-Ter des deux autres classes mais ne possèdent pas de domaine N-Ter. Elles se présentent sous la forme d'homotétramère avec un site actif par monomère où le fer s'oxyde facilement à l'air (Clay *et al.*, 2002).

ii) Le cycle catalytique

Dans le cas de la SOR de *Desulfovibrio baarsii* (classe 1), un mécanisme en trois étapes a été proposé pour la réduction de O_2^- (Mathe *et al.*, 2005) (Figure II.5).

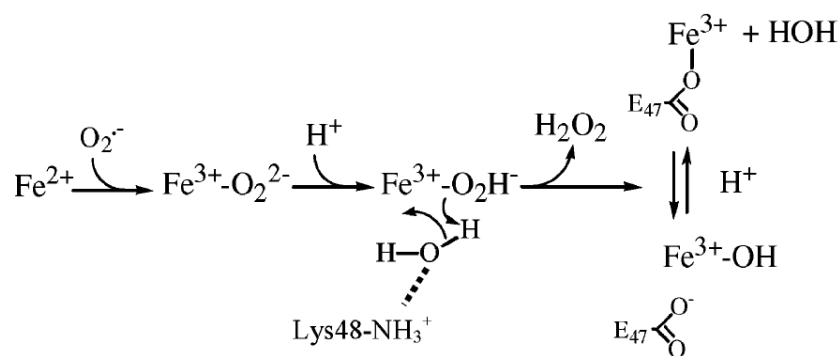


Figure II.5: mécanisme proposé pour la SOR de *D. baarsii* (Mathe *et al.*, 2005).

Dans un premier temps, l'anion superoxyde réagit avec le Fe^{2+} du site actif avec une constante de vitesse $k_1=1.10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La charge positive de la lysine proximale favoriserait cette vitesse de réaction très rapide en « guidant » l'anion superoxyde jusqu'au centre actif. Le premier intermédiaire réactionnel est proposé comme étant un Fe^{3+} -peroxo (Mathe *et al.*, 2002) résultant de la fixation de O_2^- sur la 6^{ème} position de coordination du fer. La seconde étape correspond à un processus de protonation dont la constante de vitesse est dépendante du pH, signifiant que le proton vient directement du solvant. Le second intermédiaire est supposé être un Fe^{3+} -hydroperoxo (Katona *et al.*, 2007; Wilmot, 2007). Enfin, la dernière étape consisterait en un second processus de protonation. Cette réaction serait associée à la présence d'une espèce protonée au sein du site actif qui fournirait le proton nécessaire à la libération de H_2O_2 .

Après un cycle catalytique, la SOR est oxydée et semble ne pas présenter de spécificité pour sa réduction car elle est capable d'accepter les électrons d'une large gamme de donneurs (NADPH-flavodoxine réductase Fpr, cytochromes, rubrédoxine) (Emerson *et al.*, 2003).

De façon intéressante, une observation récente indique que le site actif de la SOR présente la propriété singulière de complexer très spécifiquement une molécule de ferrocyanure $Fe(CN)_6$ (Figure II.6).

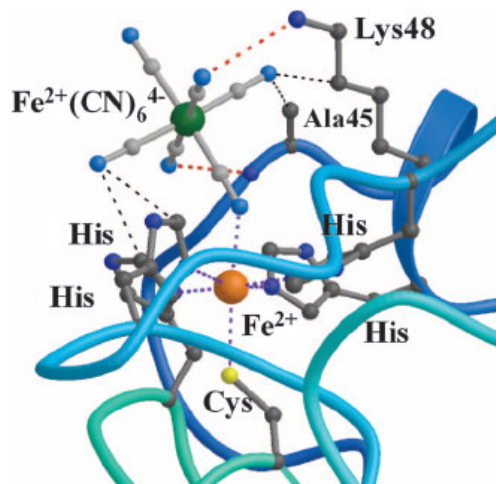


Figure II.6: représentation de la structure cristalllographique du site actif de la SOR de *D. baarsii* complexé par le ferrocyanure (Molina-Heredia *et al.*, 2006). Les liaisons hydrogène sont représentées par les tirets rouges, les interactions de Van der Waals par les tirets noirs.

Le ferrocyanure, véritable cofacteur de la SOR, est fixé au site actif par l'intermédiaire d'un pont cyano et de liaisons hydrogène entre les CN et plusieurs acides aminés de la seconde sphère de coordination du fer de la SOR. La présence de ferrocyanure modifie de façon importante la réaction de l'enzyme avec le superoxyde. En présence de ce complexe, la réaction est centrée sur l'adduit ferrocyanure et la réduction à un électron du superoxyde conduit à un alkylhydroperoxyde bien moins toxique pour la cellule que le peroxyde d'hydrogène (Molina-Heredia *et al.*, 2006).

Les superoxyde dismutases et les superoxyde réductases permettent donc de prévenir la toxicité liée à la présence d'ions superoxyde. Mais elles engendrent la production d'un autre composé potentiellement toxique, le peroxyde d'hydrogène ; les catalases et les peroxydases entrent alors en action.

c. Les catalases :

La plupart des catalases existent sous forme de tétramères de 60 ou 75 kDa, chaque sous-unité contient un site actif (hème) enfoui au sein de la structure mais accessible via des canaux hydrophobes. La catalase a été l'une des premières enzymes décrite chez la bactérie *E. coli*. Celle-ci possède deux types de catalases, HPI (homotétramère) et HPII (homohexamère)

codées respectivement par les gènes KatG (Skarstad *et al.*, 1985) et KatE (Loewen, 1984). Les catalases se trouvent presque exclusivement localisées dans les peroxysomes.

Ces enzymes catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène (Figure II.7), en utilisant le pouvoir catalytique du fer. Dans la première étape, H₂O₂ oxyde l'hème en une espèce « oxyferryl » (Fe(IV)=O) puis dans la seconde étape, une deuxième molécule d'H₂O₂ est utilisée comme réducteur pour régénérer l'enzyme, produisant ainsi de l'eau et du dioxygène.

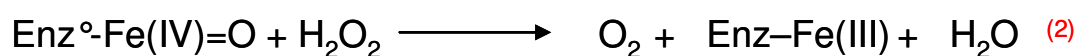
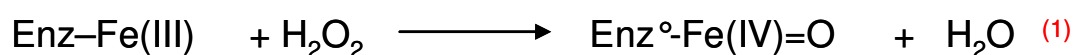


Figure II.7: réduction du peroxyde d'hydrogène en deux étapes par les catalases.

La réduction, dont la vitesse est de l'ordre de 10⁷ min⁻¹ est un processus extrêmement rapide. Selon la concentration en H₂O₂, les catalases exercent une double fonction. Si elle est faible (inférieure à 1μM), elles réalisent une réaction de peroxydation où différents donneurs d'hydrogène, potentiellement toxiques, peuvent être oxydés. Si la concentration en H₂O₂ devient trop élevée (en situation de stress oxydant), alors l'enzyme joue son rôle de détoxification, H₂O₂ est à la fois donneur et accepteur de protons (Scandalios, 2005) (Figure II.7). Des catalases à site binucléaire à manganèse ont également été découvertes, par exemple, chez les bactéries *Thermus thermophilus* (Antonyuk *et al.*, 2000) et *Lactobacillus plantarum* (Kono & Fridovich, 1983) mais nous avons choisi ici de ne pas les détailler.

d. Les peroxydases à thiol :

Ce sont de petites protéines catalysant la réduction à un électron des peroxydes (ROOH) en leur alcool correspondant (ROH), et donc H₂O₂ en H₂O.

i) Mode d'activité

Leur activité catalytique repose sur la présence d'une cystéine réactive capable de réaliser une attaque nucléophile de la fonction peroxyde. Cette réaction entraîne la libération d'une molécule d'eau ou d'alcool et la formation d'un acide sulfénique (Cys-OH) au niveau du site catalytique (Wood *et al.*, 2003b). La réactivité de la cystéine catalytique nécessite sa présence sous forme thiolate (Cys-S⁻), plus nucléophile que la forme protonée. Jusqu'ici toutes les thiol-peroxydases conservent au niveau de leur site actif un résidu arginine qui, en tant que groupement électro-attracteur, permet de diminuer le pKa de la cystéine favorisant ainsi la forme thiolate (Figure II.8).

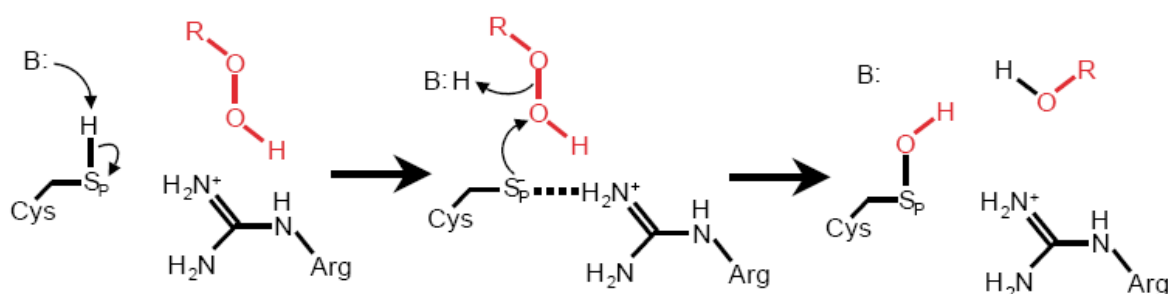


Figure II.8 : première étape de réduction des peroxydes par les peroxyrédoxines. Attaque nucléophile de la cystéine catalytique (SP) et formation d'un intermédiaire acide sulfénique (SPOH). La base responsable de la déprotonation de SP et l'acide responsable de la protonation du groupe partant RO⁺ sont tous deux notés 'B' même si ils ne représentent pas nécessairement la même entité.

L'abaissement du pKa n'est pas le seul paramètre nécessaire au fonctionnement du site catalytique. Un autre paramètre important est la capacité du site actif à protoner et ainsi à stabiliser l'espèce RO⁻, produite suite à la réduction de la fonction peroxyde mais la nature de cet acide reste à déterminer (Ellis & Poole, 1997). Une seule cystéine est responsable de la réduction des peroxydes. Cependant, l'acide sulfénique formé réagit ensuite avec une autre cystéine pour former un pont disulfure, protégeant ainsi l'enzyme d'une inactivation éventuelle associée à la « sur-oxydation » de la cystéine catalytique en acide sulfinique.

Il est également important de noter que cette sur-oxydation du thiol réactif en acide sulfinique a toujours été décrite comme une oxydation irréversible conduisant alors à une protéine inactive. Des travaux de 2003 sur la levure (*S. cerevisiae*) (Biteau *et al.*, 2003) et sur des cellules eucaryotes (Woo *et al.*, 2003) ont montré qu'une telle modification était réversible grâce à la sulfirédoxine (Srx). Cette réduction a lieu en deux étapes : une activation de l'acide sulfinique par phosphorylation en présence d'ATP suivie d'une réduction par une

fonction thiol de Srx. Cette importante découverte ouvre une nouvelle voie dans la compréhension des systèmes de défense au stress oxydant et donc dans le contrôle du potentiel redox intracellulaire, même s'il semble que ce type de réduction soit spécifique aux 2-Cys Prx que nous détaillerons dans la suite de ce paragraphe (Woo *et al.*, 2005).

ii) Les différentes familles

Deux classes majeures de peroxydases ont été décrites : les peroxyrédoxines (Prx) et les glutathion-peroxydase (Gpx).

➤ Les peroxyrédoxines :

La seconde étape du mécanisme de réduction des peroxydes permet de distinguer 3 classes de peroxyrédoxines : les 1-Cys Prx et les 2-Cys Prx « typiques » et « atypiques ».

Les 2-Cys Prx « typiques » forment la classe la plus large et la plus étudiée avec notamment la protéine AhpC de *E. coli* (Ellis & Poole, 1997; Netto *et al.*, 1996; Poole, 1996). Ces enzymes sont des homo-dimères contenant deux sites actifs identiques, l'acide sulfénique généré lors de la première étape va réagir avec la cystéine localisée en Cter (notée S_R sur la figure II.9) du second monomère entraînant la formation d'un pont disulfure intermoléculaire (Wood *et al.*, 2002).

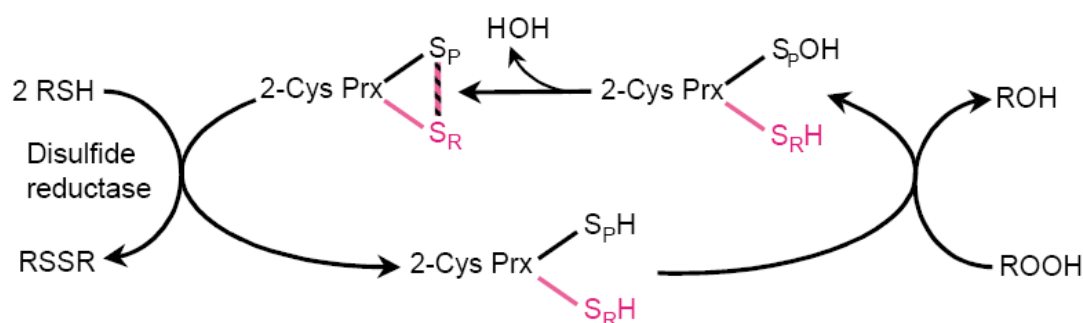


Figure II.9 : formation du pont disulfure intermoléculaire (liaison rouge et noire). Le pont disulfure peut ensuite être réduit par une disulfide réductase.

Les 2-Cys Prx « atypiques » présentent le même type de mécanisme mais sont présentes sous forme de monomères comme par exemple PrxV (Seo *et al.*, 2000). Les deux

cystéines sont présentes sur le même monomère aboutissant alors à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire.

Les 1-Cys Prx ne contiennent que la cystéine du site actif. Lorsqu'elle a réagi, elle est alors très probablement réduite par un donneur d'électrons dont la nature n'a pas encore été clairement identifiée. Par analogie avec les deux mécanismes précédents, on peut supposer que ce donneur, contenant un groupement thiol, va former un complexe avec l'enzyme par liaison disulfure qui sera ensuite lui-même réduit par un second donneur (Figure II.10).

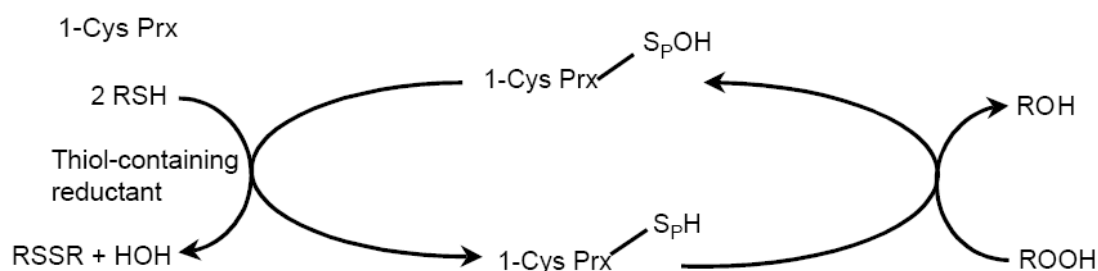


Figure II.10: la réduction des 1-Cys Prx met en jeu de petites molécules avec des fonctions thiols dont la nature reste à déterminer.

➤ Les glutathion-peroxydases :

Les glutathion-peroxydases (GPx) ont été les premières peroxydases à thiol découvertes. Elles ont été initialement décrites chez les eucaryotes supérieurs comme des sélénio-enzymes capables de catalyser la réduction des peroxydes. Leur activité catalytique repose sur l'oxydation d'une sélénocystéine en acide séléninique et sur sa réduction par le glutathion. L'acide séléninique réagit avec une molécule de GSH, formant un pont disulfure mixte entre la protéine et le glutathion (Protéine-Cys-Se-SG). Ce pont est ensuite attaqué par une deuxième molécule de GSH qui permet la réduction de la cystéine catalytique de la peroxydase et la libération d'une molécule de GSSG (Ursini *et al.*, 1995) (Figure II.11).

Il existe deux types majeurs de GPx classées selon leur spécificité de substrat : les glutathion-peroxydases classiques (GPx), catalysant la réduction des hydroperoxydes solubles et les « phospholipide-hydroperoxyde glutathion-peroxydases » (PH-GPx), capables de réduire les hydroperoxydes de lipides. Les GPx sont homotétramériques alors que les PH-GPx sont monomériques.

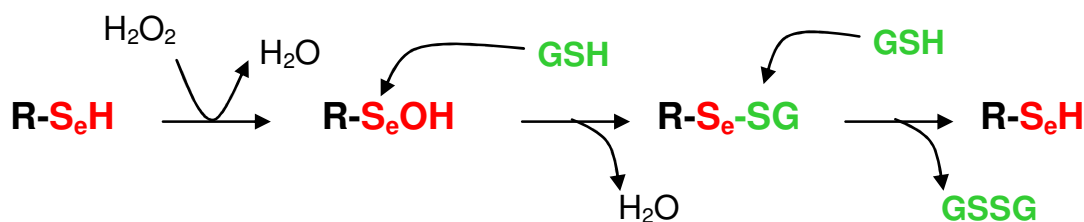


Figure II.11: La sélénocystéine catalytique réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former un acide séléninique. Cette espèce réagit ensuite avec une molécule de glutathion pour former un pont disulfure mixte, qui est ensuite réduit par une deuxième molécule de glutathion.

iii) Modes de régénération

Les peroxydases à thiol catalysent la réduction des peroxydes en alcool. Cette réduction entraîne la formation d'un pont disulfure dont la nature inter- ou intra-moléculaire dépend de la nature de la peroxydase. Ces enzymes peuvent être ensuite régénérées par réduction de ce pont disulfure. Deux grandes voies sont impliquées dans cette réduction grâce au pouvoir réducteur du NADPH : la voie des thiorédoxines et la voie du glutathion.

➤ La voie des thiorédoxines (Trx):

Les thiorédoxines catalysent la réduction de ponts disulfures grâce à une activité thiol-transférase conférée par la présence dans son site actif de deux cystéines vicinales au sein du motif conservé, Trp-Cys-Gly-Pro-Cys. Ce processus catalytique est réalisé en deux étapes ; la première cystéine du site actif réalise une attaque nucléophile du pont disulfure du substrat, entraînant la réduction d'une des deux cystéines de ce pont et la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre la Trx et son substrat. Cette liaison intermoléculaire est ensuite attaquée par la deuxième cystéine du site actif, permettant la libération du substrat réduit et de la Trx oxydée (Holmgren, 1985). Une fois oxydées, les thiorédoxines peuvent être réduites par une enzyme à FAD NADPH-dépendante, la thiorédoxine réductase (Holmgren & Bjornstedt, 1995). L'abondance et le potentiel redox très bas (-270 mV pour Trx1 chez *E. coli*) des thiorédoxines (Holmgren & Bjornstedt, 1995) en font des thiol-réductases majeures.

Dans le cas particulier de la peroxyrédoxine AhpC, sa réduction ne dépend pas directement de la voie des thiorédoxines, mais d'un système apparenté ; AhpF, dont le gène

présent sur le même opéron est exprimé avec *ahpC* (Tartaglia *et al.*, 1990). AhpF catalyse la réduction d'AhpC en utilisant le pouvoir réducteur du NADH (et dans une moindre mesure du NADPH) (Poole & Ellis, 1996), grâce à la présence au sein de la même enzyme d'un groupement FAD et de deux dithiols réactifs (Poole, 1996). Un changement de conformation de l'enzyme au cours des différents transferts d'électrons lui permet de passer de l'activité thiorédoxine réductase à l'activité thiorédoxine.

Il est intéressant de préciser que chez *E. coli*, le contrôle de la concentration en peroxydes fait intervenir de manière complémentaire les systèmes Kat et AhpCF. En effet, l'alkylhydroperoxyde réductase n'est efficace qu'aux faibles doses d'H₂O₂. Aux concentrations plus élevées en peroxyde d'hydrogène, l'activité de katG est stimulée, permettant ainsi de réduire des doses plus élevées d'H₂O₂ (Seaver & Imlay, 2001).

➤ La voie du glutathion (GSH) :

Le glutathion est un tripeptide (Glu-Cys-Gly) présent dans la cellule à des concentrations de l'ordre du millimolaire (Akerboom *et al.*, 1982) et fait donc partie des anti-oxydants les plus importants. C'est un composé redox qui peut être présent soit sous forme réduite (GSH) soit sous forme oxydée (GSSG). L'oxydation du GSH en GSSG fait intervenir la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre les résidus cystéines de deux molécules. Le couple GSH/GSSG possède un potentiel redox de -240 mV. Il participe activement à la réduction des peroxydes par le biais de glutathion peroxydases qui utilisent le GSH comme donneur d'électrons. La forme oxydée GSSG peut être réduite en deux molécules de GSH par l'action d'une enzyme à FAD NADPH-dépendante, la glutathion réductase.

Les glutarédoxines sont de petites protéines capables d'activité thiol-transférase (Holmgren & Bjornstedt, 1995). A la différence des thiorédoxines, elles utilisent le pouvoir réducteur du NADPH via le glutathion et la glutathion réductase pour catalyser la réduction de ponts disulfures ou de disulfures mixtes protéine-glutathion. Deux types de glutarédoxines ont été décrits en fonction de leur activité catalytique et de leur séquence :

- les glutarédoxines à dithiol comme Grx1 d'*E. coli* (séquence consensus CPYC), généralement associées à la réduction de ponts disulfures et des disulfures mixtes.

- les glutarédoxines à monothiol (séquence consensus PXCG/AFS/P) (bien qu'elles puissent contenir plus d'une cystéine) dont l'activité est généralement restreinte à la réduction des disulfures mixtes.

En conclusion, l'analyse de ces systèmes enzymatiques définit essentiellement deux voies de réduction des ponts disulfure, a priori distinctes, dans la régénération des peroxydases : la voie des thiorédoxines, constituée de la thiorédoxine réductase et de la thiorédoxine et la voie du glutathion, constituée de la glutathion-réductase, du glutathion et des glutarédoxines.

III. Caractérisation des mécanismes moléculaires de détection des peroxydes.

Nous avons décrit, dans le chapitre précédent, les principaux systèmes enzymatiques de dégradation des espèces réactives de l'oxygène. Ces différents systèmes sont sous le contrôle de détecteurs spécifiques. En effet, la cellule est capable de percevoir les variations de la concentration en ERO grâce à des détecteurs qui convertissent alors ce signal en réponse transcriptionnelle.

En ce qui concerne le peroxyde d'hydrogène, le senseur le mieux décrit est la protéine OxyR d'*E. coli*. La caractérisation des mécanismes moléculaires responsables de l'activation d'OxyR a permis d'établir les bases de la spécificité du processus de détection (Green & Paget, 2004; Paget & Buttner, 2003). Alors qu'OxyR sert à la fois de senseur et de régulateur dans la réponse à H₂O₂, ces deux fonctions sont découplées pour le complexe Orp1-Yap, son homologue chez *Saccharomyces cerevisiae*. Orp1 joue le rôle de détecteur d'H₂O₂ et Yap1 celui d'activateur de la transcription. Dans cette levure, les deux systèmes apparaissent également différents dans leur mode d'activation par H₂O₂. En effet, l'état d'oxydation de Yap1 dicte sa localisation subcellulaire alors que l'oxydation d'OxyR modifie sa liaison aux promoteurs des gènes cibles (Storz *et al.*, 1990; Toledano *et al.*, 1994).

Chez la bactérie *B. subtilis*, la protéine PerR (**P**eroxide **r**esistance **R**egulator), senseur d'H₂O₂, a été récemment identifiée (Bsat *et al.*, 1998). A ce jour, les mécanismes moléculaires responsables de son activation et du contrôle du régulon peroxyde ne sont pas encore totalement élucidés. L'étude biochimique et fonctionnelle de PerR constitue l'objet de mon travail de thèse. Nous nous intéresserons dans cette partie à l'étude des principaux régulateurs impliqués dans la réponse et la résistance au stress peroxydique.

A. Le système « détecteur-régulateur » OxyR chez *E.coli*.

Chez la bactérie Gram-négatif *E. coli*, OxyR est un régulateur majeur de la réponse aux peroxydes (Zheng & Storz, 2000). En effet, son invalidation entraîne une hypersensibilité aux peroxydes (Christman *et al.*, 1989). Le locus *oxyR* a été identifié pour la première fois chez *Salmonella typhimurium* parmi des mutants hyper-résistants à H₂O₂ (Christman *et al.*, 1985).

Une analyse globale de son régulon, par la technique des puces à ADN, a permis d'identifier plus d'une vingtaine de gènes dont l'expression est stimulée par le peroxyde

d'hydrogène de façon OxyR dépendante (Tao, 1997; Zheng *et al.*, 2001a; Zheng *et al.*, 2001b). Parmi ceux-ci se trouvent des gènes codant pour des enzymes de détoxification (*katG*, *ahpC*, *ahpF*), des gènes codant la voie des thiorédoxines et du glutathion (*grxA*, pour la glutarédoxine 1, *gorA*, pour la glutathion réductase et *trxC*, pour la thiorédoxine 2), des gènes codant pour d'importants régulateurs tels que *fur* ainsi que le gène *oxyS* codant pour un petit ARN antisens. Comme les autres membres de la famille LysR, OxyR peut fonctionner comme un répresseur de sa propre expression (Christman *et al.*, 1989).

1) OxyR en tant qu'interrupteur « on-off »

La forme active d'OxyR (qui se lie à l'ADN), capable de stimuler la transcription, est une forme oxydée (Storz *et al.*, 1990). En effet, des expériences d'interaction avec l'ADN ont montré que seule la forme oxydée de la protéine est capable de se fixer sur les promoteurs des gènes régulés (Toledano *et al.*, 1994). De plus, cette forme serait capable de recruter l'ARN Polymérase afin d'initier la transcription (Kullik *et al.*, 1995a).

Comme nous l'avons énoncé précédemment, OxyR est capable de « s'auto-réprimer ». Dans ce cas, sa capacité de se lier à l'ADN est indépendante de son état d'oxydation (Toledano *et al.*, 1994). En effet, la forme réduite se lie à deux fois deux sillons adjacents séparés par un tour d'hélice alors que la forme oxydée est en contact avec quatre sillons majeurs consécutifs. Dans les deux cas, la répression d'*oxyR* est maintenue. En revanche, la transcription d'*oxyS*, localisé tête-bêche avec *oxyR*, est spécifiquement induite en conditions oxydantes suite à un repositionnement d'OxyR au niveau du promoteur. Ce déplacement est dû à un changement de conformation d'OxyR lors de la transition entre les formes réduite et oxydée (Figure III.1).

L'ARN antisens OxyS, via sa complémentarité avec l'ARN messager des gènes cibles dans la région d'initiation de traduction, masque les sites de reconnaissance des ribosomes et empêche vraisemblablement la traduction des messagers. Le gène *exbB*, par exemple, est réprimé par OxyS. Ce gène code pour une protéine qui facilite l'entrée de fer dans la cellule (Wiggerich & Puhler, 2000). Lors d'un stress oxydant, OxyS empêcherait donc l'import de fer et par la même limiterait la réaction de Fenton et la production de OH[•].

OxyR peut être désactivée par réduction. Il a été suggéré, en étudiant l'activation et la désactivation de différents mutants, qu'OxyR pouvait être réduit par la glutarédoxine 1, via la voie du glutathion (Zheng *et al.*, 1998). La réduction d'OxyR *in vitro* en présence de glutarédoxine 1, de glutathion et de glutathion réductase étaye cette hypothèse. Compte tenu

de la stimulation de *gorA* et *grxA* par OxyR en réponse à H_2O_2 , il est raisonnable de penser que le système s'auto-régule (Christman *et al.*, 1985; Mukhopadhyay & Schellhorn, 1997).

Selon son état redox, OxyR apparaît donc comme un véritable interrupteur « on-off » de la réponse au stress oxydant dû à H_2O_2 .

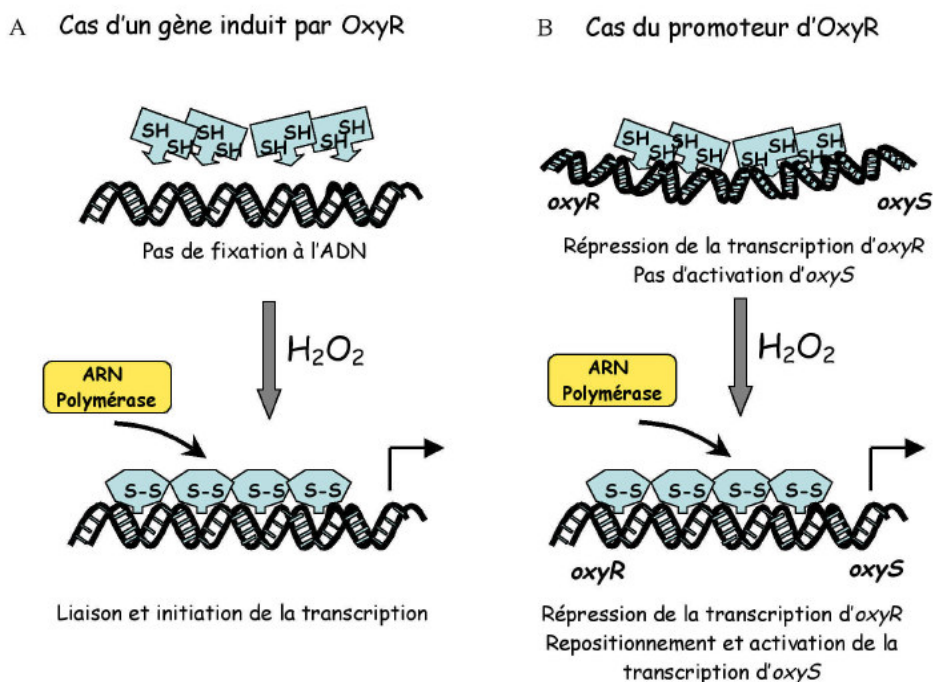


Figure III.1 : (A) modèle représentant l'induction de l'expression d'un gène cible d'OxyR (par exemple AhpC ou KatG) et (B) le rôle de répresseur joué par OxyR au niveau de son propre promoteur (thèse Delaunay, 2003).

2) Activation par formation d'un pont disulfure intramoléculaire

En solution, la protéine OxyR forme un tétramère. La partie N-terminale contient le domaine de liaison à l'ADN et la partie C-terminale le domaine dit d'oligomérisation et de régulation. Cette partie C-terminale contient, en effet, le centre redox constitué des cystéines 199 et 208 (C₁₉₉ et C₂₀₈) (Kullik *et al.*, 1995a; Kullik *et al.*, 1995b). Dans les conditions normales, les six cystéines de la protéine sont sous forme réduite et OxyR est inactive. En conditions de stress oxydant, la formation d'un pont disulfure entre C₁₉₉ et C₂₀₈ conduit au changement de conformation responsable de l'activation d'OxyR (Zheng *et al.*, 1998).

a. Les premiers travaux :

Les premiers travaux du groupe de Storz ont mis en avant le rôle de la C₁₉₉ suggérant initialement l'activation d'OxyR par formation d'un acide sulfénique après réaction avec H₂O₂ (Kullik *et al.*, 1995a; Storz *et al.*, 1990). L'activation de ce même résidu par S-nitrosylation a également été proposée par le groupe de Stamler (Hausladen *et al.*, 1996) ce qui suggère un rôle probable d'OxyR dans la réponse aux espèces réactives de l'azote (de récents travaux ont toutefois démontré un rôle limité d'OxyR dans la réponse à ce type de stress (Mukhopadhyay *et al.*, 2004)). Ces deux groupes de recherche semblaient donc s'accorder sur le fait que, parmi les six cystéines de la protéine, seule la cystéine 199 jouait un rôle dans le mécanisme de détection d'H₂O₂ par OxyR.

b. Mise en évidence du pont disulfure :

Ce consensus a basculé lorsque le groupe de Storz a proposé que le centre redox d'OxyR était constitué non seulement de la C₁₉₉ mais également de la C₂₀₈. Son groupe a démontré la formation d'un pont disulfure entre cette C₂₀₈ et la C₁₉₉ grâce à la spectrométrie de masse. Ce pont disulfure intramoléculaire conduit alors au changement de conformation responsable de l'activation d'OxyR en réponse aux peroxydes (Zheng *et al.*, 1998). En effet, la mutation de la cystéine 199 en sérine (C₁₉₉S) et, dans une moindre mesure, de la cystéine 208 en sérine (C₂₀₈S) induit une hypersensibilité aux peroxydes qui a été mesurée lors de tests de résistance par zone d'inhibition de croissance (Kullik *et al.*, 1995a). De plus, ces deux mutants sont transcriptionnellement inactifs *in vitro* comme *in vivo* (Kullik *et al.*, 1995a; Zheng *et al.*, 1998) alors que la mutagenèse des quatre autres cystéines d'OxyR n'entraîne au contraire aucune altération fonctionnelle ou phénotypique (Kullik *et al.*, 1995a). En particulier, un mutant ne possédant plus que les cystéines 199 et 208 (OxyR4C-A) présente la même activité que la protéine sauvage. L'étude par spectrométrie de masse de la protéine mutante OxyR4C-A, purifiée et oxydée à l'air, a démontré l'existence d'un pont disulfure entre les cystéines 199 et 208 (Zheng *et al.*, 1998). L'analyse par des expériences d'alkylation à l'AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid) des mutants des cystéines d'OxyR a permis de confirmer la formation, *in vivo*, de ce pont disulfure en réponse à H₂O₂ (Tao, 1999).

Le potentiel redox du couple OxyR_{red}/OxyR_{ox} est de -185 mV (Zheng *et al.*, 1998). Cette valeur, supérieure d'environ 100 mV à celle du potentiel redox intracellulaire (-280 mV), est compatible avec la présence d'OxyR sous forme réduite dans des conditions de croissance standard (Aslund *et al.*, 1999; Tao, 1999). *In vivo*, OxyR est oxydé dès 30

secondes d'exposition à H_2O_2 (Aslund *et al.*, 1999). En réponse à une dose unique d' H_2O_2 , cette oxydation est transitoire avec un retour à l'état réduit après 5 minutes d'exposition. Le profil d'oxydation d'OxyR est corrélé avec la cinétique d'activation de ses gènes cibles. Les doses requises *in vivo* pour l'oxydation d'OxyR sont faibles (à partir de 5 μM de H_2O_2 ajouté dans le milieu).

c. Bases structurales de la réactivité :

L'oxydation d'OxyR par H_2O_2 est directe (Aslund *et al.*, 1999). Une étude structurale d'OxyR a permis de confirmer la présence du pont disulfure, de caractériser l'environnement électronique de chacune des cystéines impliquées (Figure III.2) et de proposer un mécanisme de transition entre la forme réduite et la forme oxydée (Choi *et al.*, 2001).

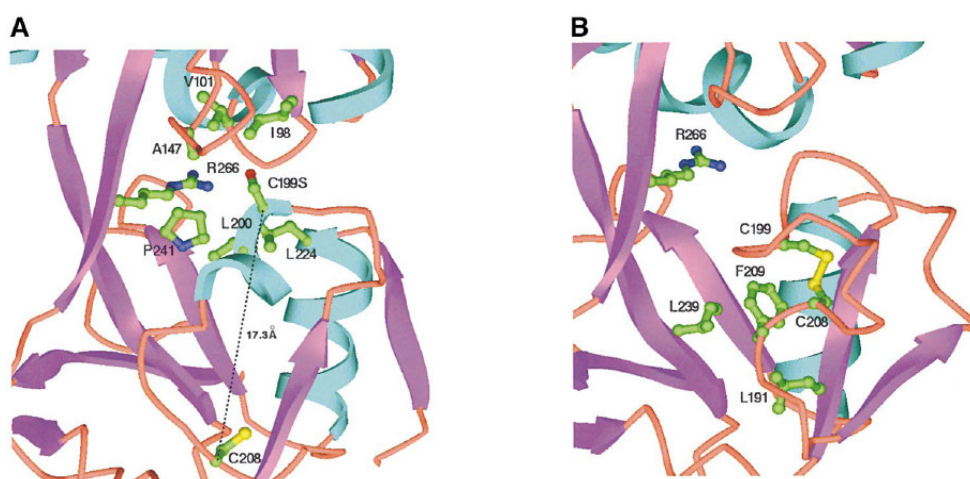


Figure III.2 : représentation de l'environnement des cystéines réactives d'OxyR (Choi *et al.*, 2001). (A) forme réduite (B) forme oxydée.

La structure cristallographique de la forme réduite d'OxyR montre que les cystéines 199 et 208 sont distantes de 17,3 Å et que la C₁₉₉ est localisée dans une étroite poche hydrophobe. La présence au sein de cette poche d'une arginine, chargée positivement, est susceptible d'augmenter la réactivité de la C₁₉₉ en la maintenant sous forme thiolate. En effet, un mutant dépourvu de cet acide aminé présente un défaut d'activation vis-à-vis d' H_2O_2 (Kullik *et al.*, 1995a). La réactivité de la C₁₉₉ pourrait également être augmentée par la proximité de trois petites hélices se comportant comme de petits dipôles attracteurs.

Ces données structurales sont cohérentes avec la propriété d'activation de C₁₉₉ par formation d'un acide sulfénique. L'environnement hydrophobe ainsi que des contraintes

stériques entraîneraient alors une « expulsion » de la cystéine oxydée. Celle-ci s'approcherait de la C₂₀₈ (elle-même présente au sein d'une région flexible ; résidus 205-216), ce qui permettrait alors la formation du pont disulfure et un réarrangement conformationnel de la protéine au niveau de sa structure secondaire (Choi *et al.*, 2001).

Ces données structurales ainsi que les données biochimiques exposées précédemment montrent bien qu'OxyR est activé par un changement de conformation de la protéine, induit par la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre les C₁₉₉ et C₂₀₈.

3) *Un mécanisme d'activation controversé*

Une étude de 2002, réalisée par le groupe de Stamler, a remis en cause le modèle d'activation d'OxyR par formation d'un pont disulfure. Il propose que seule la modification de la cystéine 199 est essentielle à l'activation de la protéine. Ce groupe a mis en évidence trois modifications de cette cystéine: C₁₉₉-SOH (acide sulfénique) en réponse au stress oxydant, C₁₉₉-SNO (nitrosothiol) en réponse au stress nitrique (modification également observée pour des cellules traitées à la S-nitrosocystéine (Hausladen *et al.*, 1996)) et C₁₉₉-S-S-G (disulfure mixte) après réaction avec le glutathion. De manière très intéressante, l'idée sous-jacente à ces travaux est que, suivant la modification, différentes réponses transcriptionnelles seraient induites ce qui suggère plusieurs rôles pour OxyR.

Stamler *et al.* n'ont pas observé de pont disulfure *in vitro*. Cependant, ces auteurs ont identifié un acide sulfénique stable au niveau de la cystéine 199. Cet acide sulfénique suffit à induire une conformation active de la protéine capable d'activer la transcription (Kim *et al.*, 2002). La stabilité de cet acide sulfénique suggère qu'aucun thiol n'est suffisamment proche pour entraîner la formation d'un pont disulfure. Cette donnée est compatible avec l'éloignement structural des cystéines 199 et 208 décrit par Choi *et al.* (Choi *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que OxyR peut être oxydé, *in vitro*, sans formation d'un pont disulfure intramoléculaire.

Le groupe de Stamler explique ces divergences en mettant en avant que l'équipe de Storz a travaillé avec une forme tronquée de la protéine pour les études cristallographiques et que la formation du pont disulfure entre C₁₉₉ et C₂₀₈ peut être liée aux conditions de cristallogenèse et à la durée (relativement longue) pour l'obtention des cristaux. Ils soulignent également que la réactivité vis-à-vis d'H₂O₂ (études *in vitro*) a été étudiée avec une protéine mutée sur les quatre cystéines du domaine de liaison à l'ADN et que ces mutations peuvent modifier la réactivité de la cystéine C₁₉₉.

4) Conclusion

L'hypothèse du groupe de Stamler suggérant une régulation fine du régulon OxyR en fonction de l'état d'oxydation de la cystéine 199 est très intéressante. Cependant, aucune preuve formelle de l'existence de la forme Cys199-SOH n'a pu être apportée *in vivo*. De plus, des expériences de migration sur gel à l'aide de la protéine sauvage et de la protéine mutée ont permis de mettre en évidence le pont disulfure controversé (Tao, 1999). Une explication possible de la « non détection » du pont disulfure par le groupe de Stamler est que, lors de leurs expériences, aucune précaution n'a été prise pour éviter la réduction de ponts disulfures éventuels lors de l'extraction cellulaire (Georgiou, 2002). En effet, un réarrangement de ponts disulfures, au sein de protéines « redox-dépendantes », est souvent observée si certaines précautions, telles que l'utilisation de piègeurs de cystéines libres, ne sont pas mises en œuvre (Kishigami *et al.*, 1995). Par ailleurs, seules les cystéines 199 et 208 sont parfaitement conservées chez les homologues d'OxyR.

Les derniers travaux publiés confirment également une activation de la protéine via un mécanisme en deux étapes conduisant à la formation du pont disulfure C₁₉₉-C₂₀₈ intramoléculaire (Lee *et al.*, 2004). Des études de fluorescence basées sur l'unique résidu tryptophane en position 175 d'OxyR ont montré que l'oxydation de la cystéine 199 en acide sulfénique ne suffit pas, à elle seule, à induire un changement de conformation. Par contre, le changement de conformation peut être relié à la formation du pont disulfure. De plus, après réaction avec H₂O₂, le passage à la forme oxydée est extrêmement rapide avec une constante de vitesse de l'ordre de 9.7 s⁻¹. Cette forme oxydée se trouve alors dans un état « contraint » favorisant un retour rapide à l'état sous la forme réduite. Ces deux paramètres (oxydation très rapide et conformation oxydée « contrainte ») dirigent de manière remarquable la réactivité d'OxyR (Lee *et al.*, 2004).

B. Le relais Orp1-Yap1 chez *S. cerevisiae*.

Chez la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*, la réponse au peroxyde d'hydrogène est essentiellement contrôlée par le facteur de transcription Yap1. Son absence entraîne une hypersensibilité à H₂O₂ ainsi qu'une perte de la capacité d'adaptation (Kuge & Jones, 1994; Schnell *et al.*, 1992; Stephen *et al.*, 1995). La famille AP-1 (Activating Protein-1) regroupe des facteurs de transcription se fixant sur l'ADN au niveau du site AP-1 (TGACTCA) (Ikner

& Shiozaki, 2005). Yap1 constitue un homologue de cette famille chez *S. cerevisiae* (Moye-Rowley *et al.*, 1989). C'est une protéine de 650 acides aminés appartenant également à la famille des « leucine-zipper » à domaine basique (b-ZIP).

Les études du régulon Yap1 par gel d'électrophorèse bi-dimensionnelle (Lee *et al.*, 1999) ou par la technique des puces à ADN (Gasch *et al.*, 2000) ont permis d'identifier au moins 70 protéines dont l'expression est contrôlée par Yap1 en réponse à H₂O₂. Parmi celles-ci, on retrouve la majorité des protéines anti-oxydantes (Collinson & Dawes, 1995; Grant *et al.*, 1996; Kuge & Jones, 1994; Morgan *et al.*, 1997) incluant par exemple les superoxydes dismutases, les enzymes des voies des thiorédoxines et du glutathion (thiorédoxine TRX2, thiorédoxine réductase TRR1, glutathion réductase GLR1).

Il est également intéressant de noter que lors d'un crible recherchant des mutants hyper-sensibles au peroxyde d'hydrogène le facteur de transcription Skn7 a été identifié (Krems *et al.*, 1995; Krems *et al.*, 1996). Celui-ci est nécessaire à l'induction d'environ la moitié des gènes du régulon Yap1 dont notamment les gènes codant pour la voie de thiorédoxines (Lee *et al.*, 1999) suggérant une coopération entre Yap1 et Skn7.

1) L'activité de Yap1 dépend de sa localisation subcellulaire

Kuge *et al.* (Kuge *et al.*, 1997) ont été les premiers à mettre en évidence la sensibilité redox de Yap1 en observant son changement de localisation subcellulaire suite à un stress oxydant. En l'absence de stress, Yap1 est majoritairement cytoplasmique. Cette localisation est le résultat d'un processus dynamique impliquant l'import de Yap1 dans le noyau grâce à l'importine Pse1 (Isoyama *et al.*, 2001) et son export hors du noyau grâce à l'exportine Crm1 (aussi connue sous le nom de Xpo1) (Yan *et al.*, 1998). En présence d'H₂O₂, Yap1 est activé par oxydation. Son interaction avec Crm1 est interrompue et la protéine s'accumule alors rapidement dans le noyau (Figure III.3) où elle active l'expression de ses gènes cibles. L'activation de Yap1 est rapide (en 1 minute) et transitoire (environ 30 à 45 minutes (Delaunay *et al.*, 2000)).

Cette activation implique deux domaines riches en cystéine (**Cysteine Rich Domains** CRDs) au sein desquels se trouve un motif composé de trois cystéines. Ces domaines présents aux extrémités C-terminale et N-terminale de Yap1 sont appelés respectivement c-CRD (résidus 586 à 650) et n-CRD (résidus 281 à 320). En outre, la partie C-terminale de Yap1 contient un signal d'export nucléaire (NES, région riche en résidus hydrophobes tels que des leucines et isoleucines) permettant l'interaction avec Crm1. L'oxydation de Yap1 conduit à la

formation d'un pont disulfure entre les cystéines 598 (domaines c-CRD) et 303 (domaine n-CRD) entraînant un changement de conformation (Kuge *et al.*, 2001). Le signal d'export nucléaire est ainsi masqué empêchant l'interaction de Yap1 avec Crm1 (Delaunay *et al.*, 2000) (Yan *et al.*, 1998).

Un second pont disulfure entre les cystéines 310 et 629 a récemment été mis en évidence (Wood *et al.*, 2003a). Même si son existence *in vivo* n'a pas encore été établie, celui-ci peut très probablement stabiliser la protéine en la maintenant sous sa forme oxydée.

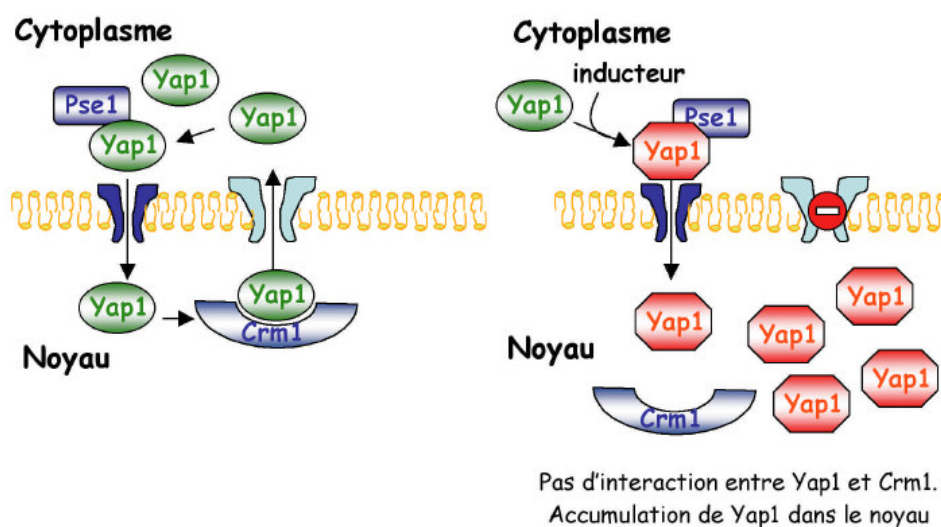


Figure III.3 : en absence de stress, Yap1 est continuellement importé dans le noyau par l'importine Pse1 et exporté hors du noyau par l'exportine Crm1. En présence d'un stress oxydant, l'interaction entre Yap1 et Crm1 est interrompue et Yap1 s'accumule dans le noyau (Delaunay *et al.*, 2000).

2) Les premières données structurales

Le changement de conformation de Yap1 est dû à la formation d'un pont disulfure entre deux cystéines distantes de près de 300 acides aminés. Récemment, ce pont disulfure a été mis en évidence par la résolution de la structure par spectroscopie RMN d'une construction comprenant les domaines c-CRD et n-CRD de Yap1 (Wood *et al.*, 2004). Cette structure montre que les résidus valine 616 (Val₆₁₆), leucine 619 (Leu₆₁₉) et 623 (Leu₆₂₃) constituant le NES et situés sur l'hélice c- α_3 interagissent avec les résidus phénylalanine 302 (Phe₃₀₂) et méthionine 306 (Met₃₀₆) situés sur l'hélice n- α_1 . Le NES est ainsi masqué (Figure III.4). Le résidu Phe₃₀₂ maintient la Leu₆₁₉ dans un environnement hydrophobe et interagit également avec Val₆₁₆. La chaîne latérale de la Met₃₀₆ interagit directement avec Leu₆₂₃. Ces

deux résidus se trouvent alors enfouis au sein de la cavité centrale hydrophobe du domaine c-CRD.

Différentes mutations ont permis de vérifier l'importance de ces interactions pour la « non accessibilité » du NES. Elles ont également mis en évidence le rôle critique des résidus Phe₃₀₂ et Met₃₀₆ suggérant que la formation du pont disulfure C₃₀₃-C₅₉₈ de Yap1, à elle seule, n'est pas suffisante pour stabiliser le changement de conformation. Ces résidus pourraient également affecter les potentiels redox des cystéines 303 et 310 situées à proximité.

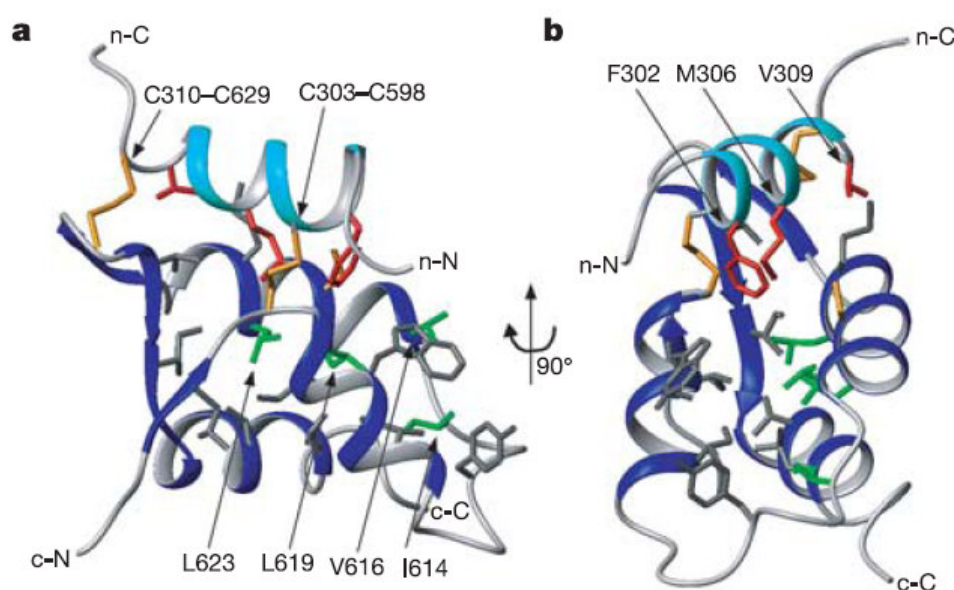


Figure III.4 : inhibition du NES par l'hélice n- α_1 (Wood *et al.*, 2004). (a) l'hélice n- α_1 et le domaine c-CRD sont respectivement en couleur cyan et bleu foncé. Les résidus composant le NES (Ile 614, Val 616, Leu 619, Leu 623) sont en vert. (b) rotation de 90° de la figure (a) laissant apparaître les résidus de l'hélice (Phe 302, Met 306, Val 309 en rouge).

3) Orp1 est le véritable senseur d'H₂O₂

Des données génétiques et biochimiques de Yap1 suggèrent que la formation du pont disulfure C₃₀₃-C₅₉₈ responsable du changement de conformation requiert la présence d'une autre protéine. En effet, dans des cellules où la protéine Orp1 (**O**xidant **r**eceptor **p**eroxidase 1) est absente, Yap1 n'est pas oxydée par H₂O₂. Orp1 semble donc jouer un rôle dans le mécanisme de détection du peroxyde d'hydrogène (Delaunay *et al.*, 2000; Delaunay *et al.*, 2002; Toledano *et al.*, 2004).

Orp1 est une petite protéine de 20 kDa décrite à l'origine comme une glutathion peroxydase (Gpx3) en raison de son homologie de séquence avec cette famille de peroxydases

(Avery & Avery, 2001). Elle présente trois cystéines dont une en position 36 qui fait partie du site actif chez cette classe de peroxydases. Cependant, même si la protéine présente une activité peroxydase *in vitro* (un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 36 et 82 au sein d'Orp1 a été observé), *in vivo*, elle jouerait plutôt le rôle d'un senseur d'H₂O₂ (Delaunay *et al.*, 2002). Dans ces conditions, la cystéine 82 joue un rôle secondaire. En effet, sa mutation n'entraîne pas de modification dans la réponse à H₂O₂.

Le groupe de M. Toledano a démontré que H₂O₂ oxydait la cystéine 36 d'Orp1 en acide sulfénique (Cys₃₆-SOH). Celui-ci réagit alors avec la cystéine 598 de Yap1 pour former un pont disulfure intermoléculaire qui est converti en pont disulfure intramoléculaire impliquant les cystéines 303 et 598 de Yap1 (Figure III.5).

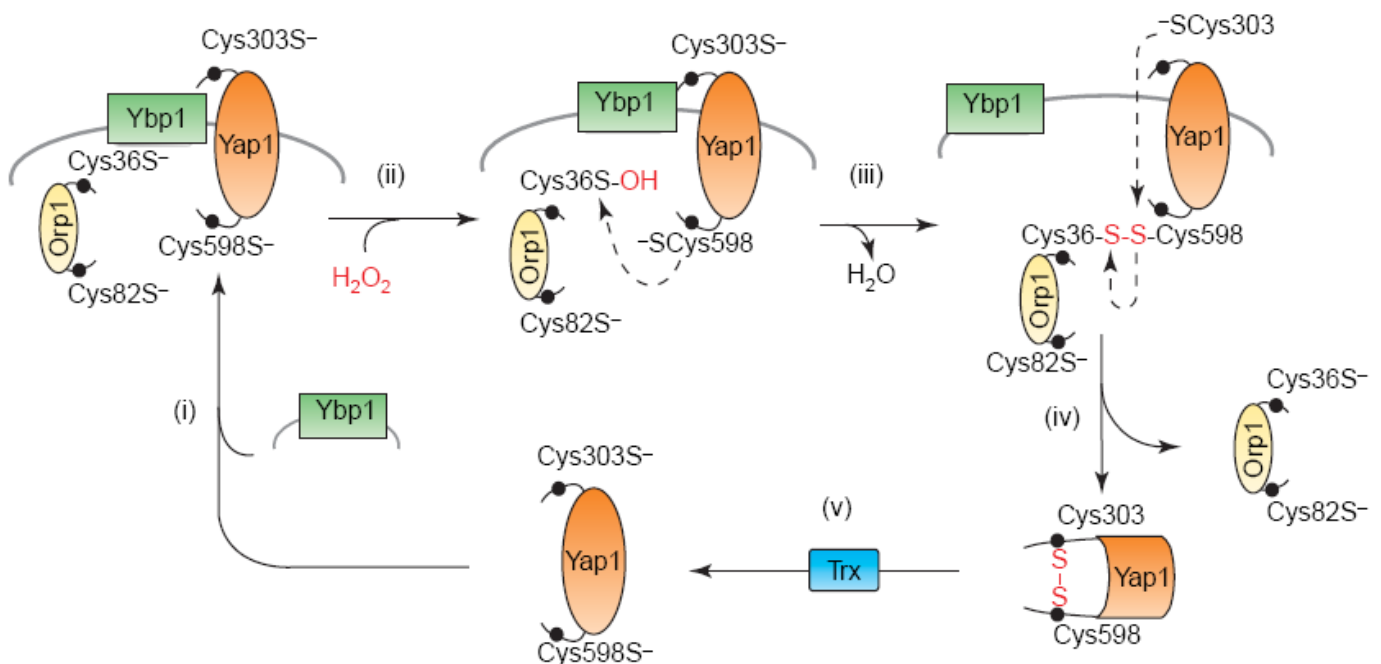


Figure III.5 : processus d'oxydation de Yap1 contrôlé par Orp1 (Toledano *et al.*, 2004) (i) Orp1 s'associe avec Yap1 qui est déjà en interaction avec Ybp1 (ii) formation d'un acide sulfénique au niveau de la C₃₆ d'Orp1 après réaction avec H₂O₂ (iii) Cys₃₆-SOH réagit avec la Cys₅₉₈ de Yap1, formation d'un pont disulfure intermoléculaire (iv) réaction d'échange entre la Cys₃₆ d'Orp1 et la Cys₃₀₃ de Yap1, conversion du pont disulfure intermoléculaire en pont disulfure intramoléculaire, Yap1 est sous la forme active (v) réduction de Yap1 oxydé par la thiorédoxine.

La présence d'un troisième partenaire, Ybp1 (**Y**ap1 **b**inding **p**rotein), a été mise en évidence (Veal *et al.*, 2003). En son absence le pont disulfure intermoléculaire Orp1-Yap1 ne se forme pas. Néanmoins, le mécanisme moléculaire d'action n'a pas encore été élucidé. Ybp1 pourrait se comporter comme une protéine chaperone en favorisant le rapprochement de

la cystéine 598 de Yap1 et de l'acide sulfénique Cys₃₆-SOH d'Orp1. Elle pourrait également empêcher l'activité peroxydase d'Orp1 en limitant la formation du pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 36 et 82.

Comme indiqué sur la figure III.5 (étape v), Yap1 peut être inactivée par réduction via la voie des thiorédoxines (Carmel-Harel *et al.*, 2001). L'identification du système Orp1/Yap1 suggère que chez *S. cerevisiae*, comme chez *E. coli*, la concentration intracellulaire en peroxydes est soumise à un contrôle homéostatique.

4) H_2O_2 n'est pas le seul activateur de Yap1

Yap1 peut également être activé par des composés chimiques comme le diamide (Kuge & Jones, 1994), les métaux lourds tels que le cadmium (Wemmie *et al.*, 1994) et d'autres composés électrophiles (Kuge & Jones, 1994). Cependant, les mécanismes moléculaires d'activation sont différents de ceux impliqués lors de la réponse à H_2O_2 (Azevedo *et al.*, 2003). En effet, ces réponses sont indépendantes d'Orp1. Les cystéines 598, 620 et 629 du domaine c-CRD de Yap1 forment un second centre redox et sont directement impliquées, soit par oxydation en pont disulfure (Kuge *et al.*, 2001), soit par alkylation, soit dans la coordination de métaux tels que le cadmium. Ces modifications entraîneraient alors un changement de conformation (différent de celui induit par H_2O_2) conduisant à une altération du NES. L'interaction de Yap1 avec Crm1 serait donc abolie permettant une accumulation de Yap1 dans le noyau. Dans ce second mode d'activation, Yap1 joue donc le rôle à la fois de détecteur et de régulateur. Cependant, aucune donnée ne semble indiquer qu'un tel mode d'activation existe *in vivo*.

5) Conclusion

Contrairement à *E. coli* où la réponse au peroxyde d'hydrogène n'implique que la protéine OxyR, chez *S. cerevisiae* un système de « relais » entre deux partenaires est impliqué. Par l'oxydation de sa cystéine 36 en acide sulfénique, Orp1 détecte la présence d' H_2O_2 et transmet cette information à Yap1 qui, une fois oxydée, va s'accumuler dans le noyau et permettre ainsi l'activation des gènes de la réponse au stress oxydant.

Yap1 n'est donc pas oxydée directement. Pourtant, les cystéines C₅₉₈ et C₆₂₉ de son domaine c-CRD sont directement impliquées dans la réponse à d'autres molécules électrophiles. On peut donc se demander comment les mêmes résidus sont capables de réagir

selon deux modes différents. La forme thiolate de la cystéine est nécessaire mais probablement pas suffisante pour permettre son oxydation par les peroxydes. De plus, la réduction du peroxyde entraînant la formation d'un alcoolate (RO^-), l'environnement de la cystéine doit permettre la stabilisation de cet alcoolate avec notamment la présence d'une espèce capable de lui céder un proton (Ellis & Poole, 1997). Il est possible que Yap1 ne possède pas un tel environnement favorable à proximité de ses cystéines réactives (ce qui justifie le rôle d'Orp1 dans la détection d' H_2O_2). Il est également possible que la formation d'un pont disulfure entre Yap1 et Orp1 permette le rapprochement des cystéines 303 et 598 de Yap1 et favorise la formation du pont disulfure intramoléculaire nécessaire à son activité.

C. La réponse aux peroxydes chez *Bacillus subtilis*.

Chez la bactérie Gram-positif *B. subtilis*, la réponse aux peroxydes est sous le contrôle de trois facteurs de transcription (Helmann *et al.*, 2003) : σ^B (activité générale de réponse au stress), OhrR (activé par les peroxydes organiques) et PerR (activé par H_2O_2).

1) *Le facteur σ^B*

Les facteurs sigma sont des sous-unités de l'ARN polymérase. Ils assurent la spécificité de la transcription en jouant un rôle déterminant dans la sélection des sites de fixation de l'enzyme pour l'étape de transcription.

Découvert en 1979 comme le premier facteur sigma chez la bactérie (Haldenwang & Losick, 1979), σ^B contrôle de manière positive plus de 120 gènes (Price *et al.*, 2001). Cependant, σ^B ne répond pas spécifiquement à un stress oxydant et les gènes qu'il régule peuvent être activés en réponse à différents types de stress (Hecker *et al.*, 1996) tels qu'un choc thermique, un stress acide, la présence excessive de sels, d'éthanol, ou encore en absence de glucose. Les protéines ainsi activées semblent donc participer à une réponse générale et non-spécifique permettant la survie de la bactérie en conditions non favorables. Les gènes contrôlés par σ^B ont été classés en 6 groupes :

- Protection directe (protéases, catalases, thiorédoxine...)
- Modulation de l'activité de σ^B (facteurs anti-sigma, phosphatases...)
- Régulation de σ^B (membres des familles de AraC, DeoR et EbsC...)

- Influx et efflux (perméases, systèmes anti-port et symport)
- Métabolisme (glucosidase, déshydrogénases et pyruvate oxydase)
- Dégradation (cystéine protéase, ribonucléase R)

En réponse à un stress oxydant (peroxydes notamment), les catalases KatB et KatX, permettant la dégradation d'H₂O₂, sont induites ainsi que Dps qui est une protéine de protection de l'ADN et OsmC qui joue un rôle d'hydroperoxydase organique (Hecker & Volker, 2001).

L'activation de σ^B en réponse à un stress atteint un maximum après 10 à 40 minutes et décroît rapidement ensuite (Voelker *et al.*, 1997). Cependant, les mécanismes d'activation en réponse à un stress oxydant sont encore aujourd'hui mal connus.

2) *Le facteur OhrR*

Le gène *ohr* a été identifié chez *Xanthomonas campestris*. Il code une famille de protéines anti-oxydantes. En effet, des expériences de complémentation de ce gène, chez des souches d'*E. coli* déficientes en *ahpC*, ont montré sa capacité à restaurer une résistance aux peroxydes organiques en induisant la synthèse de ces protéines anti-oxydantes (Mongkolsuk *et al.*, 1998). Cette famille de protéines est présente chez de nombreuses bactéries et leur régulation est contrôlée par le facteur de transcription OhrR (Sukchawalit *et al.*, 2001). OhrR est un membre de la famille MarR (**M**ultiple **a**ntibiotic **r**esistance), famille de protéines se liant à l'ADN via un motif « winged-helix » (Ellison & Miller, 2006) (motif « winged helix » ou wHTH).

Chez *B. subtilis*, OhrR se présente sous la forme d'un homo-dimère de 147 acides aminés par sous-unité. Il régule l'expression du gène *ohrA* codant pour une peroxydase à thiol (OhrA) responsable de la majorité de l'activité alkyl-hydroperoxydase (Fuangthong *et al.*, 2001). OhrR réprime l'expression d'*ohrA* et, *in vivo*, il est spécifiquement activé par les hydroperoxydes organiques. *In vitro*, la forme oxydée d'OhrR ne se lie plus sur sa séquence de reconnaissance mais le traitement par un réducteur tel que le DTT permet de restaurer cette liaison (Fuangthong & Helmann, 2002).

a. Deux modes d'activation :

OhrR présente un unique résidu cystéine en position 15. Celui-ci est nécessaire à la levée de répression d'*ohrA*, et donc à l'activation d'OhrR. Dans un premier temps,

l'utilisation de la spectrophotométrie UV-visible associée à la spectrométrie de masse a permis au groupe de Helmann de montrer que la cystéine 15 est oxydée *in vitro* en acide sulfénique. Ce produit d'oxydation relativement stable conduirait à la dissociation du complexe OhrR/ADN et à la transcription du gène *ohrA* (Fuangthong & Helmann, 2002).

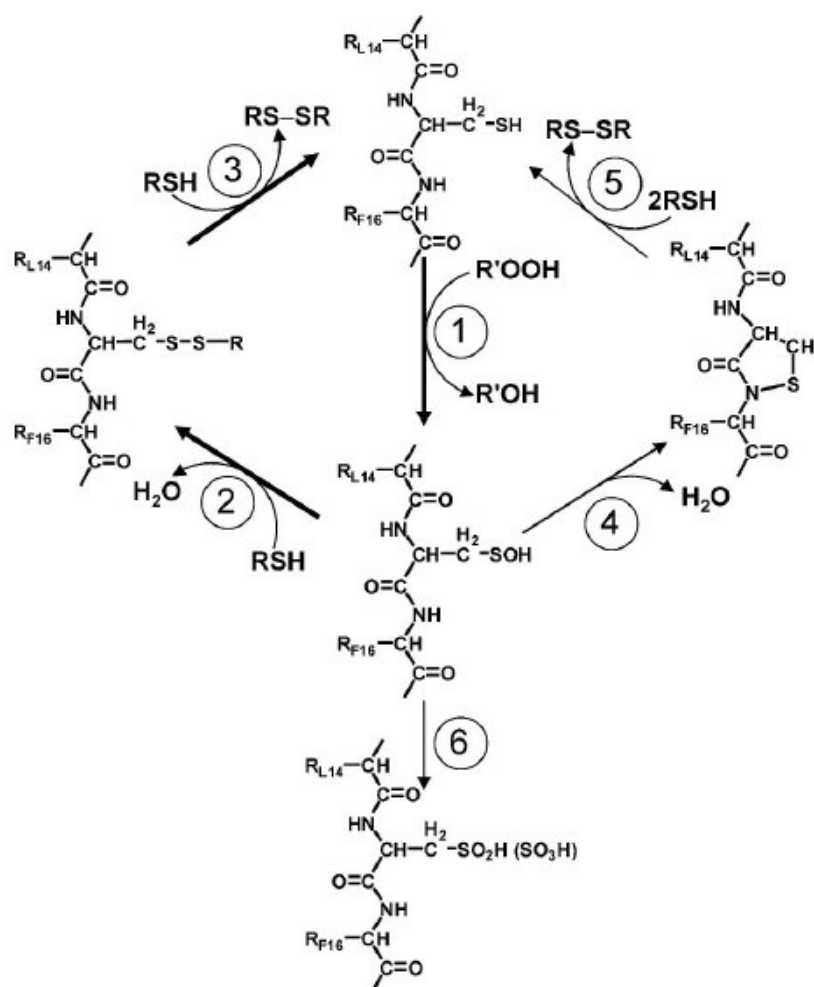


Figure III.6 : mécanisme de détection des hydroperoxydes organiques par OhrR (Lee *et al.*, 2007). OhrR réagit rapidement avec $R'OOH$ (1), il y a formation d'un intermédiaire acide sulfénique. Celui-ci peut réagir ensuite avec une fonction thiol (2) entraînant la formation d'un pont disulfure intermoléculaire qui peut ensuite être réduit (3). L'acide sulfénique peut également réagir avec l'amide de la liaison peptidique pour former un sulfénamide (4) qui peut être réduit par des réactions d'échange avec des fonctions thiols (5). Si la concentration intracellulaire en thiols disponibles est trop faible, une sur-oxydation en acide sulfonique peut avoir lieu (6).

Très récemment, ces auteurs ont montré qu'en réalité l'oxydation de la cystéine en acide sulfénique n'était pas suffisante pour provoquer la dissociation OhrR/ADN (Lee *et al.*, 2007). Celle-ci serait provoquée soit par la formation d'un pont disulfure (avec des cystéines libres, le co-enzymeA ou une petite molécule de 398 Da contenant un résidu thiol) soit par la condensation avec l'amide de la liaison peptidique pour former un sulfénamide (Figure III.6). La formation d'un pont disulfure intermoléculaire permettrait par ailleurs de prévenir la sur-

oxydation irréversible de l'acide sulfénique en acide sulfinique ou en acide sulfonique. De plus, cette voie permettrait une régénération de la protéine OhrR via des réactions d'échange avec de petites molécules comportant des fonctions thiols.

b. Les données structurales :

La structure cristallographique de la forme réduite d'OhrR de *B. subtilis* a été résolue avec une résolution de 2,5 Å pour un mutant OhrR C15S (cystéine mutée en sérine) et une résolution de 3,4 Å pour la forme sauvage d'OhrR (Hong *et al.*, 2005). Les deux structures, résolues par des techniques différentes, sont identiques. OhrR apparaît bien sous la forme d'un homo-dimère où chaque monomère est constitué de 6 hélices α et de 3 brins β (Figure III.7).

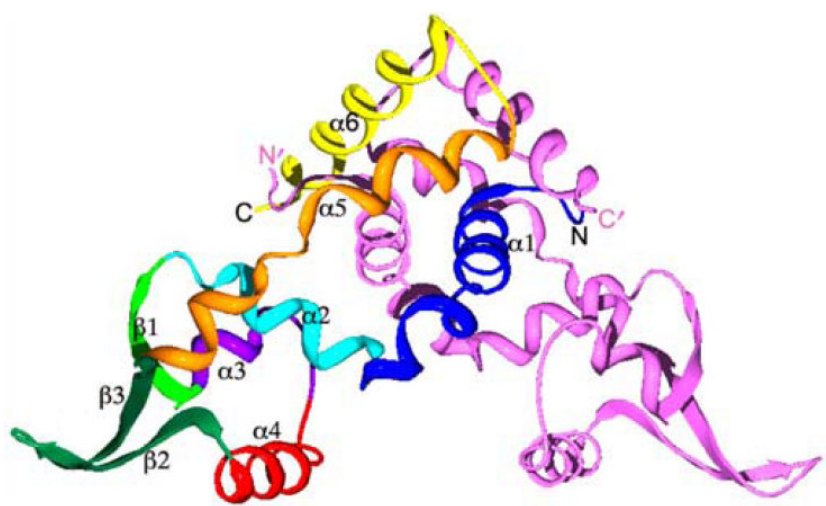


Figure III.7 : structure cristallographique de la protéine OhrR (*B. subtilis*) sous la forme réduite (Hong *et al.*, 2005). Les différentes hélices α et brins β sont numérotés.

De plus, la structure du complexe OhrR/ADN (promoteur du gène *ohrA*) a été obtenue avec une résolution de 2,64 Å (Hong *et al.*, 2005). Le domaine de liaison à l'ADN (wHTH) est composé des hélices α_3 et α_4 , ainsi que des brins β_1 , β_2 et β_3 . Pour se lier à sa séquence de reconnaissance, le motif wHTH d'une des sous-unités de la forme réduite d'OhrR effectue une rotation de 25°. Les hélices du motif wHTH sont alors en contact avec deux sillons majeurs consécutifs de l'ADN. Au total, 44 acides aminés d'OhrR établissent 60 contacts avec 22 nucléotides de l'ADN (Figure III.8).

La structure du complexe ADN/protéine révèle que OhrR bloque la transcription en empêchant l'accès de l'ARN polymérase à la zone -10 du promoteur *ohrA*. Cette étude a également permis de caractériser l'environnement électronique de la cystéine 15 responsable de l'inactivation de la protéine. Elle est impliquée dans des interactions hydrogène avec les résidus tyrosine 29 et 40 de l'autre sous-unité ainsi qu'avec une molécule de solvant (indiquant son accessibilité, Figure III.9). Son pK_a est environ égal à 5,2 (Hong *et al.*, 2005). Ces liaisons hydrogène peuvent stabiliser la forme thiolate de la cystéine, favorisant ainsi sa réactivité vis-à-vis des peroxydes.

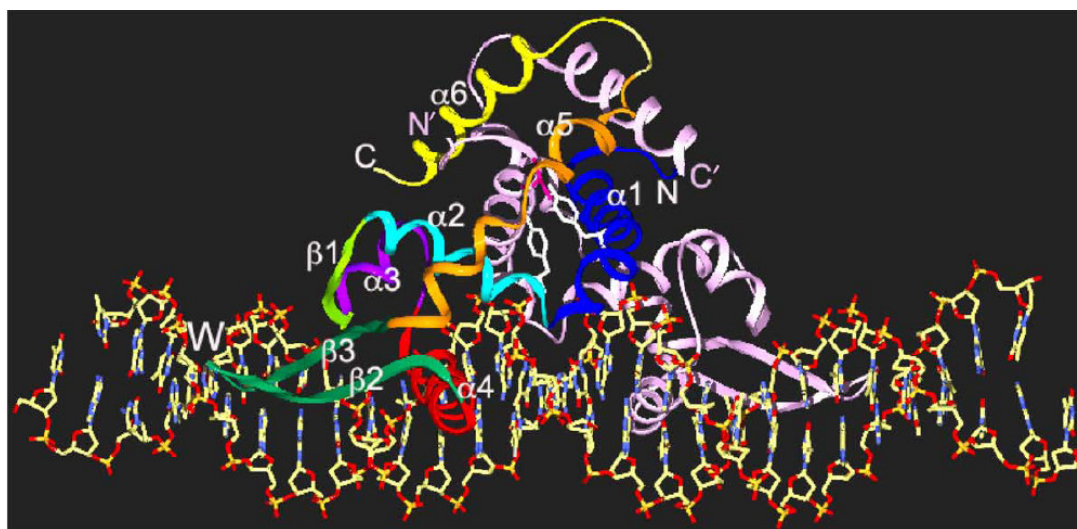


Figure III.8 : représentation de la structure cristallographique du complexe OhrR/ADN (Hong *et al.*, 2005).

OhrR répond de manière spécifique aux alkyl-hydroperoxydes plutôt qu'au peroxyde d'hydrogène. A proximité de la cystéine réactive, la présence d'une longue chaîne d'acides aminés aromatiques et non polaires au niveau de l'hélice α_2 (Y₄₃LALLLLW₅₀, majoritairement conservés chez les homologues d'OhrR, Figure III.9) explique très probablement cette spécificité. Cette chaîne d'acides aminés se comporterait comme une véritable « piste d'atterrissage » (en bleu sur la figure III.9) pour l'hydroperoxyde organique. Cette hypothèse a, par ailleurs, été vérifiée chez *X. campestris* (Klomsiri *et al.*, 2005).

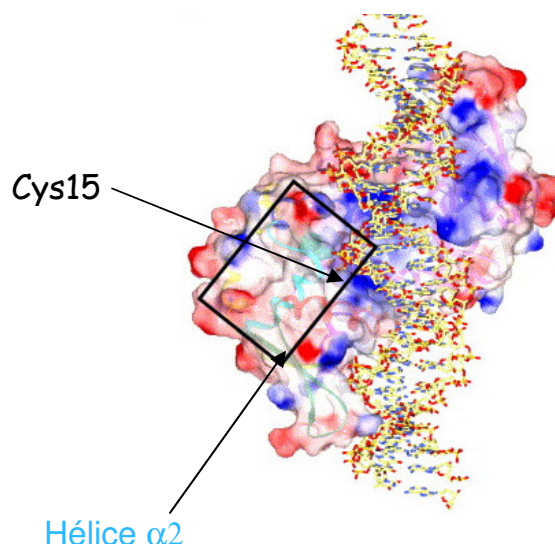


Figure III.9 : représentation des potentiels électroniques de surface de la protéine OhrR liée à l'ADN. Les zones positives, négatives et neutres sont respectivement représentées en rouge, bleu et blanc (Hong *et al.*, 2005).

3) Le facteur PerR

Nous décrivons, dans cette partie, les principales données sur la protéine PerR (**P**eroxyde **r**esistance **R**egulator) présentes dans la littérature. Les études les plus avancées sur ce régulateur sont celles du groupe de John Helmann chez *Bacillus subtilis*. Son groupe a identifié le régulon PerR et défini le rôle de la protéine en étudiant l'expression, contrôlée par PerR, de certaines protéines. Nous ferons un point de la littérature correspondant au début de notre travail et détaillerons plus précisément les travaux les plus récents du groupe d'Helmann. Ces travaux, concernant notamment le mécanisme d'activation de PerR par le peroxyde d'hydrogène, la caractérisation du site à zinc de la protéine et son interaction avec l'ADN, seront discutés à la lumière de nos données dans la partie « résultats et discussion » de ce manuscrit. Nous mentionnerons très brièvement à la fin de ce chapitre quelques points importants décrits dans la littérature sur des protéines PerR et « PerR-like » d'autres micro-organismes.

La protéine PerR a été caractérisée pour la première fois chez *B. subtilis* (Bsat *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 1995) en tant que métalloprotéine appartenant à la famille de Fur (**F**erric **u**ptake **r**egulator). PerR est le régulateur global de la réponse à H₂O₂ chez cet organisme et il est de ce fait un analogue fonctionnel d'OxyR d'*E. coli*. En conditions normales, PerR agit comme un répresseur de la transcription. Les premières avancées dans la compréhension du mécanisme contrôlant la réponse au stress peroxydique chez *B. subtilis* ont été réalisées lors

de l'analyse de la régulation du gène *mrgA*. Ce gène code pour une protéine de protection de l'ADN (homologue de Dps) (Chen & Helmann, 1995; Chen *et al.*, 1995). L'expression de cette protéine est dépendante de la présence d'un métal. En excès de manganèse ou de fer, le gène *mrgA* est réprimé par PerR (Bsat *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 1993).

a. PerR existe sous deux formes :

Comme d'autres protéines « Fur-like » dimériques (Lee & Helmann, 2007), PerR est un homo-dimère de 145 acides aminés (Herbig & Helmann, 2001). Des études biochimiques réalisées *in vivo* et *in vitro* indiquent la présence de deux sites métalliques. Le premier site, supposé structural, contient un atome de zinc (Zn^{2+}). Le second site, dit de régulation, présente une forte affinité pour le fer (Fe^{2+}) ou pour le manganèse (Mn^{2+}). La protéine peut donc exister sous deux formes ; PerR-Zn-Fe et PerR-Zn-Mn (Moore & Helmann, 2005). En outre, la présence du métal de régulation est indispensable pour la fixation à l'ADN (Herbig & Helmann, 2001).

b. Les gènes régulés par PerR :

Le régulon de PerR comprend le gène *mrgA* cité précédemment, les gènes codant pour une catalase (KatA (Chen *et al.*, 1995)), une alkyl-hydroperoxyde réductase (AhpCF (Bsat *et al.*, 1996)), des enzymes de biosynthèse de l'hème (HemAXCDBL (Chen *et al.*, 1995)), et un transporteur du zinc (ZosA (Gaballa & Helmann, 2002)). PerR régule aussi sa propre expression ainsi que celle de la protéine Fur (Fuangthong *et al.*, 2002). KatA et AhpCF dégradent les peroxydes respectivement par dismutation et réduction. Par analogie aux autres membres de la famille de Dps (Andrews *et al.*, 2003), MrgA est supposé séquestrer le Fe^{2+} l'empêchant de réagir avec H_2O_2 via la réaction de Fenton et ainsi de générer des radicaux hydroxyles (voir chapitre 1). Enfin, ZosA augmente l'import de zinc probablement dans le but de protéger les thiols réactifs en favorisant leur complexation (Gaballa & Helmann, 2002).

c. Mode d'action :

Dans les conditions physiologiques, *in vivo*, PerR est fixée sur l'ADN au niveau de sa séquence de reconnaissance appelée «PerR-box ». Une séquence consensus chez *B.subtilis*, a été déterminée (motif 7-1-7 ; TTATAATNATTATAA). Cette fixation empêche la transcription par l'ARN polymérase des gènes régulés par PerR. Chacun de ces gènes est précédé d'une ou plusieurs «PerR-box » (Fuangthong & Helmann, 2003).

En présence de peroxyde d'hydrogène (Fuangthong *et al.*, 2002), la protéine est oxydée et la fixation à l'ADN de PerR est abolie. Il y a donc levée de répression et la transcription peut avoir lieu. *In vitro*, l'absence de manganèse ou de fer entraîne également une levée de répression (Fuangthong *et al.*, 2002). PerR utilise donc le manganèse ou le fer comme co-répresseur.

Des tests d'expression de différents gènes régulés par PerR ont été effectués par le groupe d'Helmman. Ces expériences ont été réalisées en milieu minimum avec un excès de Mn^{2+} ou de Fe^{2+} en présence de H_2O_2 (Fuangthong *et al.*, 2002; Herbig & Helmann, 2001). Les données indiquent que les deux formes de la protéine PerR-Zn-Fe et PerR-Zn-Mn diffèrent dans leur réponse au peroxyde d'hydrogène. En effet, la forme à fer est très réactive vis-à-vis d' H_2O_2 alors que la forme à manganèse est relativement insensible. La protéine PerR-Zn-Mn joue essentiellement un rôle de répresseur de la transcription. Ce résultat suggère donc que la forme à fer est le véritable senseur des peroxydes *in vivo* (Moore *et al.*, 2004). Ces auteurs mentionnent également que, parmi les gènes du régulon PerR, seuls *perR* et *fur* ne sont pas activés en présence d' H_2O_2 et donc très probablement réprimés par la protéine PerR-Zn-Mn. Ce résultat confirme que la protéine PerR peut exister, *in vivo*, sous différentes formes métallées et que les gènes régulés par PerR ne sont pas tous inductibles par le peroxyde d'hydrogène (Fuangthong *et al.*, 2002).

d. Les premières hypothèses du mécanisme d'oxydation :

Au début de ce travail de thèse, le mécanisme moléculaire d'oxydation de PerR par le peroxyde d'hydrogène n'était pas connu. Le groupe d'Helmman avait émis trois hypothèses pour expliquer les événements moléculaires conduisant à la levée de répression des gènes régulés par PerR (Gaballa & Helmann, 2002; Herbig & Helmann, 2001).

Dans une première hypothèse, H_2O_2 réagit directement avec le métal de régulation. Celui-ci est alors oxydé et relargué, entraînant la levée de répression. PerR peut ensuite fixer un autre métal divalent et s'associer de nouveau à l'ADN.

Dans la deuxième hypothèse, une ou plusieurs cystéines de la protéine sont ligands du métal de régulation et réagissent directement avec H_2O_2 . Leur oxydation conduirait alors à la formation d'un pont disulfure entraînant le relargage du métal. Ce modèle, fortement inspiré des senseurs du peroxyde d'hydrogène tels que OxyR ou Orp1-Yap1, explique l'effet d'agents réducteurs tels que le DTT. En effet, lors d'expériences d'empreintes sur l'ADN, le DTT restaure la capacité de fixation d'une protéine qui a été oxydée par H_2O_2 (Herbig & Helmann, 2001).

Une dernière hypothèse indique que la réaction d' H_2O_2 avec le métal de régulation (en l'occurrence Fe^{2+}) entraîne la formation du radical hydroxyle OH^\bullet (Réaction de type Fenton). Comme dans les précédentes hypothèses, le métal oxydé est relargué. OH^\bullet peut également oxyder un ou plusieurs ligands du site de régulation ce qui conduit à l'inactivation de la protéine. Un tel mécanisme d'oxydation centré sur le métal (« **Metal-Catalysed Oxidation** » ou MCO) conduit à une oxydation irréversible de la protéine et donc à sa dégradation. Comme Fe^{2+} est beaucoup plus réactif que Mn^{2+} vis-à-vis d' H_2O_2 , cette hypothèse explique la différence de sensibilité entre les formes PerR-Zn-Fe et PerR-Zn-Mn.

e. Réaction d'oxydation centrée sur le métal de régulation :

Dans deux études très récentes (Lee & Helmann, 2006a; Lee & Helmann, 2006b), le groupe d'Hellman tranche pour la troisième hypothèse en excluant le rôle des cystéines dans le mécanisme de détection du peroxyde d'hydrogène.

Par homologie avec la structure de la forme active de Fur de *Pseudomonas aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003), ces auteurs proposent que les quatre cystéines de chaque monomère de PerR (Cystéines 96, 99, 136 et 139) lient le zinc structural avec une très forte affinité (site de type Zn-Cys₄). Ce groupe montre également que la mutation de ces cystéines conduit à une forme instable de la protéine *in vivo* (Lee & Helmann, 2006a).

Cinq autres résidus sont proposés comme ligands du métal de régulation (Histidines 37, 91 et 93, Acides aspartiques 85 et 104 ; Figure III.10) (Lee & Helmann, 2006a). Des expériences de mutagenèse dirigée indiquent que l'ensemble de ces résidus est essentiel à la fonction de répresseur de PerR *in vivo*. Ces travaux soulignent la différence de sensibilité vis-à-vis d' H_2O_2 des formes PerR-Zn-Fe et PerR-Zn-Mn (Lee & Helmann, 2006b); la forme à fer étant environ 1000 fois plus réactive que la forme à manganèse.

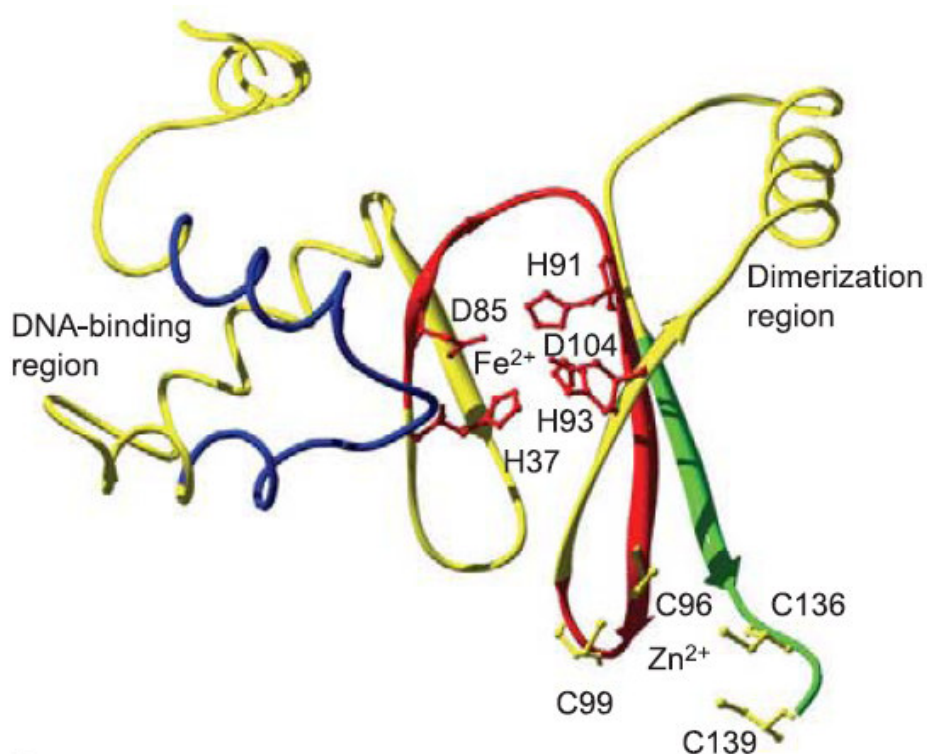


Figure III.10 : monomère de PerR modélisé à partir de la structure de Fur de *P. aeruginosa* Fur (SwissModel27). Les ligands potentiels du fer sont représentés en rouge et ceux du zinc en jaune.

En présence de H_2O_2 , la réaction localisée sur le métal de régulation (Fe^{2+}), entraîne l'oxydation des histidines 37 et/ou 91 présentes dans la première sphère de coordination du métal (Lee & Helmann, 2006a). Cette oxydation diminue l'affinité du site pour son métal conduisant à son relargage. PerR se dissocie alors de l'ADN, il y a levée de répression de la transcription, permettant l'expression des protéines impliquées dans la prise en charge des espèces réactives de l'oxygène et la protection cellulaire.

Selon le groupe d'Helmann, H_2O_2 réagit avec le fer du site de régulation selon une réaction de type Fenton conduisant à la formation du radical hydroxyle OH^\cdot . Celui-ci oxyde alors sélectivement une histidine ligand du métal de régulation en 2-oxohistidine (Figure III.11). Ce mécanisme d'oxydation centrée sur le métal contraste de manière étonnante avec les autres senseurs d' H_2O_2 qui réagissent au niveau de leurs fonctions thiol (Paget & Buttner, 2003). Au départ suspectée, l'oxydation des thiols est beaucoup trop lente *in vivo* pour être considérée comme le centre de la réactivité (Lee & Helmann, 2006b). En outre, même en présence de concentrations très élevées en H_2O_2 (10 mM), l'oxydation des cystéines de la forme PerR-Zn-Mn n'est pas observée *in vivo* (Lee & Helmann, 2006b).

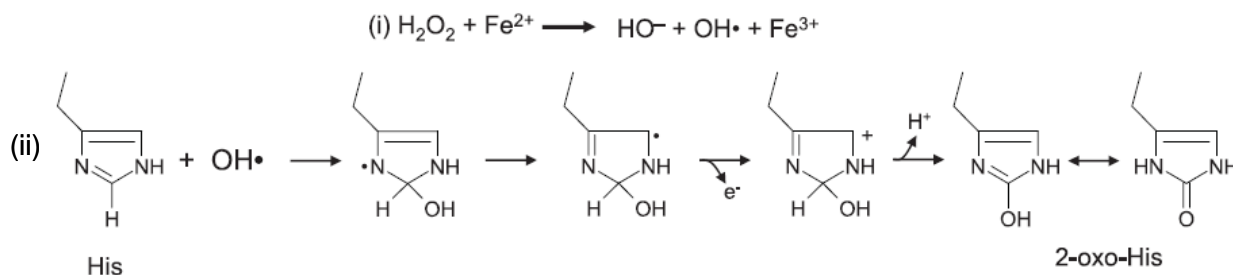


Figure III.11 : formation de 2-oxo-histidine. Le radical hydroxyle, généré par une réaction de type Fenton (i), réagit rapidement avec un ligand histidine (ii).

f. PerR est présent chez de nombreux organismes :

Les protéines PerR et « PerR-like » (protéines senseurs d' H_2O_2 de la famille de Fur) ont été décrites chez une grande variété d'organismes. PerR est notamment présent chez la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus*. En plus de réguler, comme chez *B. subtilis*, l'expression des gènes impliqués dans la résistance au stress oxydant, PerR contrôle un régulon de stockage du fer (Horsburgh *et al.*, 2001). La répression de la transcription est liée de manière spécifique à la fixation du manganèse par la protéine. En présence de concentrations élevées en fer, il y a levée de répression (Horsburgh *et al.*, 2001; Morrissey *et al.*, 2004). Il n'est pas encore clairement établi si le fer peut agir comme co-répresseur chez ce microorganisme.

Chez *Streptococcus pyogenes* (organisme déficient en catalase), PerR est le seul membre de la famille de Fur (King *et al.*, 2000). Bien que PerR soit également le régulateur principal de la réponse à H_2O_2 , les enzymes AhpC (alkyl-hydroperoxyde réductase) et GpoA (glutathion réductase) ne sont pas régulés par PerR (King *et al.*, 2000). En outre, PerR aurait certaines fonctions de Fur telles que la répression du transporteur de complexes fer-hydroxamate PhuADB (Brenot *et al.*, 2005).

Chez *Streptomyces coelicolor*, c'est une protéine « PerR-like », CatR, qui régule la transcription de la catalase KatA (Hahn *et al.*, 2000).

La protéine PerR a également été identifiée chez *Listeria monocytogenes* (Rea *et al.*, 2005) et chez *Campylobacter jejuni* (van Vliet *et al.*, 1999).

De par sa diversité et sa présence chez des organismes pathogènes, toute étude visant à mieux comprendre le mode de fonctionnement et d'activation de la protéine PerR peut permettre à plus long terme de considérer cette protéine comme une cible thérapeutique potentielle.

IV. Oxydation d'acides aminés catalysée par un métal.

A ce jour, l'étude des mécanismes de régulation de différents senseurs d'H₂O₂ tels que la protéine OxyR d'*E. coli* ou le système Orp1-Yap1 de *S. cerevisiae* a mis en évidence une réactivité centrée au niveau des fonctions thiols.

En ce qui concerne PerR de *B. subtilis*, les travaux du groupe d'Helmann, que nous avons présentés dans la partie précédente, ont montré que la levée de répression des gènes régulés par la protéine résultait de l'oxydation d'un résidu histidine, ligand du métal de régulation, en 2-oxohistidine via une oxydation catalysée par le métal (« Metal-Catalyzed Oxidation », MCO). Ce mécanisme de détection est impliqué pour la première fois dans un processus de régulation. H₂O₂ réagirait avec le fer lié par la protéine selon une réaction de type Fenton, générant ainsi un radical hydroxyle (OH[•]) qui apparaît donc comme le véritable régulateur de l'activité de PerR.

Lors d'une oxydation catalysée par le métal, il y a formation d'une espèce réactive qui va oxyder très rapidement un résidu impliqué dans la liaison au métal (Berlett & Stadtman, 1997). Un tel mécanisme d'oxydation (ou plutôt de dégradation) des protéines est peu documenté dans la littérature. Une explication possible peut être la difficulté d'identifier clairement l'espèce réactive responsable de l'oxydation ou encore de déterminer les acides aminés impliqués ainsi que leur mécanisme d'oxydation. Les quelques exemples de la littérature concernent soit de petits peptides modèles étudiés à des fins mécanistiques soit des métalloprotéines contenant un atome de Fe²⁺ ou de Cu⁺ et réagissant avec H₂O₂.

Nous présenterons dans le paragraphe suivant quelques exemples d'oxydation de protéines catalysée par un métal ainsi que le mécanisme proposé conduisant à ces modifications chimiques. Ces exemples mettent principalement en avant le rôle du radical hydroxyle dans l'oxydation des protéines et plus particulièrement dans l'oxydation du résidu histidine en 2-oxo-histidine.

1) Une réactivité sélective et localisée

L'oxydation d'un résidu histidine en 2-oxohistidine représente une voie importante de l'oxydation des protéines *in vivo* aboutissant à leur dégradation. C'est, par exemple, le cas de la glutamine synthétase (Farber & Levine, 1986), de l'hormone de croissance humaine (hGH ;

(Chang *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997) ou encore de la superoxyde dismutase à Cu/Zn (Cu/Zn SOD ;(Kurahashi *et al.*, 2001; Lewisch & Levine, 1995).

Les études réalisées sur ces protéines permettent de mettre en évidence quelques propriétés importantes. La première est que ce type de mécanisme d'oxydation est très sélectif. En effet, la réactivité est très souvent localisée au niveau du site métallique. Cela implique que les acides aminés liés au métal sont généralement la cible de l'oxydation via un tel mécanisme (Amici *et al.*, 1989; Farber & Levine, 1986). Par exemple, la glutamine synthétase, qui comme son nom l'indique est impliquée dans la synthèse de la glutamine (incorpore la seconde molécule d'ammoniac pour former la chaîne latérale de la glutamine à partir du glutamate), est inactivée par une MCO. Cette inactivation est la conséquence de l'oxydation du résidu histidine 269 (ligand du fer) en 2-oxo-histidine (Farber & Levine, 1986; Lewisch & Levine, 1995). Malgré la présence d'autres acides aminés proches, susceptibles d'être oxydés (séquence Met-His₂₆₉-Cys-His-Met), l'histidine 269 est le seul acide aminé modifié détecté. Dans cette étude, le rôle de OH[•] a été mis en avant dans l'oxydation de l'histidine. De plus, l'incapacité pour des piègeurs de radicaux libres d'inhiber la réaction d'oxydation suggère que, s'il y a formation de radical hydroxyle, celui-ci reste très localisé au niveau de son site de « production » pour réagir avec un acide aminé très proche (Stadtman & Berlett, 1991).

Une autre propriété de ces MCO mise en évidence lors de l'étude de hGH est l'importance de la géométrie du site de liaison du métal ainsi que la conformation de la protéine. Le site métallique de cette protéine est constitué en partie par les résidus histidine 18 et 21 liées au Cu⁺ (Cunningham *et al.*, 1991). Par des études cinétiques d'oxydation, couplées à la spectrométrie de masse, les auteurs ont mis en évidence l'oxydation de ces histidines en 2-oxo-histidine. L'histidine 18 est oxydée à 100% et l'histidine 21 à hauteur de 50% (Zhao *et al.*, 1997). La conformation de la protéine semble expliquer ces taux d'oxydation aussi élevés. En effet, le propanol, qui a la propriété de modifier la conformation de hGH (Wicar *et al.*, 1994), est capable d'inhiber la réaction d'oxydation. De plus, des expériences d'oxydation sur les peptides libres issus de la digestion trypsique de la protéine native et contenant les histidines 18 et 21 ne montrent aucune modification de ces acides aminés (Schoneich, 2000). Par conséquent, l'oxydation d'une histidine via une MCO serait en partie contrôlée par la séquence et la structure de la protéine mais également par la géométrie du site métallique au sein de la protéine.

2) Un mécanisme d'oxydation encore mal défini

Les études mécanistiques réalisées au niveau des protéines sont assez peu détaillées dans la littérature. Le mécanisme d'oxydation reste donc encore incertain. Cependant, la voie radicalaire, avec l'intervention du radical hydroxyle comme espèce oxydante, est largement mise en avant. Bien qu'il n'ait pas été clairement identifié, cet intermédiaire radicalaire est proposé pour l'inactivation, *in vitro*, de la superoxyde dismutase à Cu/Zn. Comme nous l'avons vu dans la seconde partie de cette introduction, la Cu/Zn SOD est une enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Fridovich, 1989). *In vitro*, cette enzyme peut être inactivée par réaction avec le produit qu'elle forme (Ookawara *et al.*, 1992). Elle peut, en effet, être oxydée par H_2O_2 via une MCO impliquant le cuivre présent au sein de l'un de ses sites métalliques (Hodgson & Fridovich, 1975). La réaction entre le cuivre et H_2O_2 conduirait à la formation de radicaux hydroxyles (Sato *et al.*, 1992; Yim *et al.*, 1993) responsables notamment de l'oxydation du résidu histidine 118 qui est l'une des quatre histidines ligands du cuivre (Getzoff *et al.*, 1983; Lewisch & Levine, 1995). La présence d' OH^\bullet a été mise en évidence grâce un piègeur de radicaux libres tel que le DMPO (Yim *et al.*, 1993).

Le mécanisme le plus simple serait l'addition du radical OH^\bullet sur la position C_2 du cycle imidazole de l'histidine. Des calculs ont montré que cet adduit est le plus favorisé du point de vue énergétique (Samuni & Neta, 1973). Il y a ensuite réduction du Cu^{2+} en Cu^+ et déprotonation pour conduire à la 2-oxohistidine (Schoneich, 2000) (Figure IV.1).

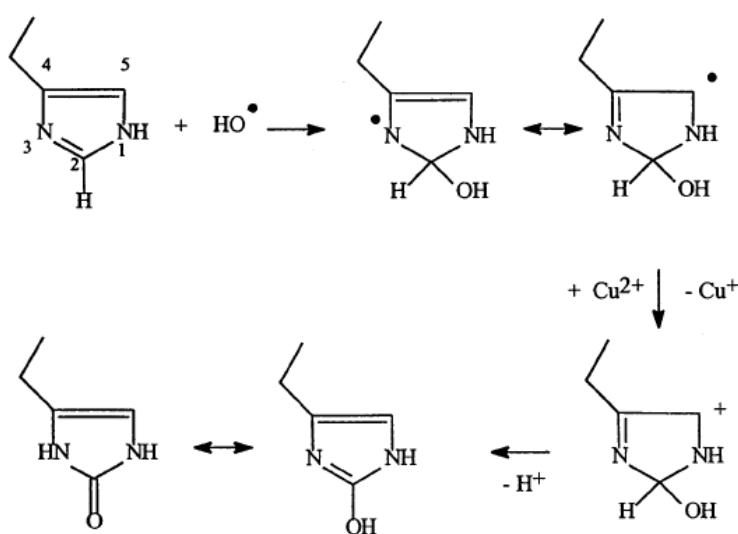


Figure IV.1 : addition du radical hydroxyle en position C_2 du cycle imidazole de l'histidine.

Cependant, une étude plus récente a montré, par des expériences de RPE, qu' OH^\bullet pouvait s'additionner sur un cycle imidazole au niveau des positions C_2 et C_5 même si cette dernière est substituée (Lassmann *et al.*, 1999). L'addition en C_2 conduit bien à la formation de 2-oxohistidine mais pas celle en C_5 (Figure IV.2).

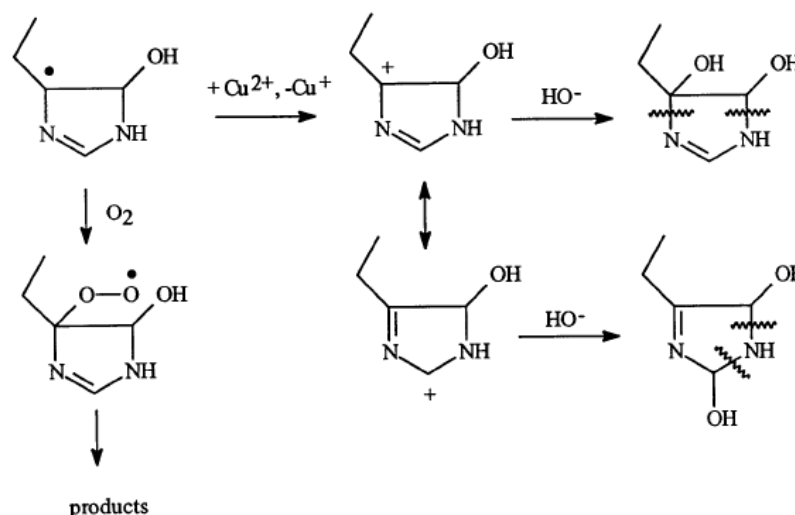


Figure IV.2 : addition du radical hydroxyle en position C_5 du cycle imidazole de l'histidine.

La capacité d'éliminer une molécule d'eau après addition d' OH^\bullet en position C_5 pourrait être une alternative (Samuni & Neta, 1973) (Figure IV.3). En principe, cette réaction requiert des conditions basiques mais l'emplacement de l'histidine au sein de la protéine (proximité de résidus basiques) peut le permettre. Si cette élimination est possible alors un adduit en C_5 peut être converti en adduit en C_2 et donc conduire à la formation de 2-oxohistidine.

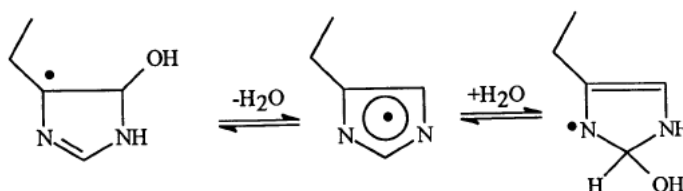


Figure IV.3 : élimination d'une molécule d'eau après addition d' OH^\bullet en position C_5 .

Ces deux voies de réactivité possibles pour le radical hydroxyle peuvent donc expliquer les différences observées dans les taux de conversion des histidines chez hGH. En effet, pour l'histidine 18, qui est très majoritairement convertie en 2-oxohistidine, l'adduit du radical aurait lieu prioritairement en position C_2 . Alors que pour l'histidine 21, qui est oxydée

à 50%, cette addition aurait lieu soit sur la position C₂ soit sur la position C₅. De plus, la géométrie particulière du site de fixation du métal doit certainement favoriser l'adduit de OH[•] en C₂.

3) *Le mécanisme d'activation de PerR*

Comme nous venons de le voir, les MCO présentent une réactivité sélective et très localisée. Ces propriétés expliquent donc très probablement pourquoi PerR utilise un tel mécanisme pour la détection d'H₂O₂. Par analogie avec ces modèles, la réactivité de la protéine vis-à-vis d'H₂O₂ est vraisemblablement orientée par la géométrie du site à fer, ainsi que par la nature et le nombre de ses ligands et donc plus globalement par la première voire la seconde sphère de coordination du métal.

Helmann propose un mécanisme radicalaire pour l'inactivation de la protéine PerR *in vivo*. Le peroxyde d'hydrogène réagirait avec le fer du site de régulation entraînant la production de OH[•] via une réaction de type Fenton. Ce radical oxyderait alors spécifiquement les résidus His37 et/ou His91 impliqués dans la liaison du fer. De façon générale, les études mécanistiques réalisées à ce jour ne permettent pas de démontrer avec certitude si le mécanisme de ces MCO fait intervenir le radical hydroxyle ou non. Par exemple, E.R. Stadtman a montré que les MCO n'étaient pas inhibées par la présence de piègeurs d'OH[•] (Stadtman & Berlett, 1991). De plus, Dean et al. ont montré que la présence de radicaux libres entraînait la conversion des histidines en acide aspartique plutôt qu'en 2-oxohistidine (Dean *et al.*, 1989). Ces données suggèrent que le mécanisme réactionnel conduisant à l'inactivation de PerR n'implique pas forcément la formation d'OH[•].

4) *Exemples de protéines à fer non hémunique*

Une autre voie possible est le passage par une espèce intermédiaire oxydante du type Fe-oxo à haut degré d'oxydation. En effet, un tel intermédiaire a été mis en évidence lors de l'étude de protéines à fer non hémiques telles que la taurine α -cétoglutarate (α -KG) dioxygénase (TauD) d'*E. coli* (Farquhar *et al.*, 2005) et la prolyl-4-hydroxylase (P4H) de *Paramecium bursaria* *Chlorella virus 1* (Hoffart *et al.*, 2006). Cette voie peut donc être raisonnablement envisagée dans le cas de la protéine PerR.

Ces deux enzymes font partie de la famille des dioxygénases α -KG dépendantes. C'est une famille d'enzymes catalysant d'importantes réactions telles que la biosynthèse du collagène et la synthèse d'espèces anti-oxydantes (Costas *et al.*, 2004 ; Hausinger, 2004). Les membres de cette famille réalisent le couplage de la réduction d'O₂ avec l'hydroxylation de leur substrat et la décarboxylation du co-facteur (α -KG). Cette réaction est réalisée au sein d'un centre à fer non-héminique où le fer est coordonné par un motif conservé (His)₂(Asp/Glu) impliquant deux résidus histidine et un résidu acide aspartique ou acide glutamique (« facial triad »). Ce mécanisme est supposé être conservé au sein de cette famille et un mécanisme consensus impliquant quatre intermédiaires a été proposé (Costas *et al.*, 2004). Il est représenté figure IV.4.

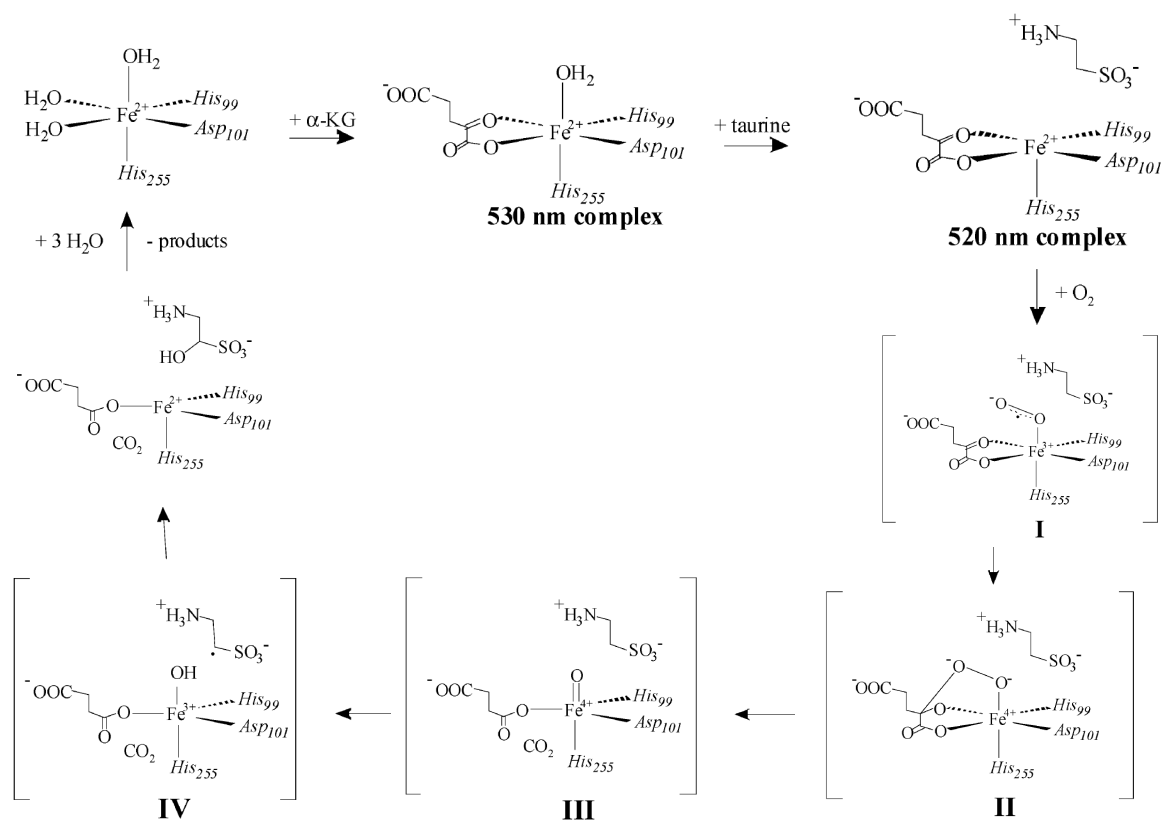


Figure IV.4 : mécanisme réactionnel proposé pour la réduction d'O₂ par les dioxygénases α -KG dépendantes (Krebs *et al.*, 2005).

L'utilisation de techniques de cinétique rapide telles que le « stopped flow » et le « rapid-mix freeze-quench » couplées à la spectroscopie Mössbauer a permis de mettre en évidence ces intermédiaires réactionnels et permet donc une meilleure compréhension des

mécanismes impliquant des enzymes à fer. Ces intermédiaires réactionnels ont d'abord été caractérisés dans le cas de TauD (Krebs *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2003a; Price *et al.*, 2003b) et ensuite dans le cas de P4H (Hoffart *et al.*, 2006). Les auteurs ont réussi à mettre en évidence la présence d'une espèce haut-spin Fe(IV)-oxo (espèce III sur la figure IV.4) responsable de l'oxydation du substrat de l'enzyme (hydroxylation sur la position C1 de la taurine par exemple dans le cas de TauD). Cependant, en absence de substrat, la réduction d'O₂ peut avoir lieu, ce qui entraîne une auto-oxydation de l'enzyme. Dans le cas de TauD, un acide aminé à proximité du centre à fer est oxydé par l'espèce Fe(IV)-oxo. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré qu'il s'agit de la tyrosine 73 (Ryle *et al.*, 2003).

De manière analogue à TauD et à P4H, on peut supposer, que dans le cas de PerR, une espèce à haut degré d'oxydation générée par la réaction d'H₂O₂ avec le Fe²⁺ présent au niveau du site de régulation puisse être responsable de l'oxydation des résidus histidine situées à proximité. De nombreuses expériences restent à mener afin de mieux comprendre le mécanisme réactionnel de PerR avec H₂O₂.

Adam, V., Royant, A., Niviere, V., Molina-Heredia, F. P. & Bourgeois, D. (2004). Structure of superoxide reductase bound to ferrocyanide and active site expansion upon X-ray-induced photo-reduction. *Structure* **12**: 1729-1740.

Akerboom, T. P., Bilzer, M. & Sies, H. (1982). The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. *J Biol Chem* **257**: 4248-4252.

Amici, A., Levine, R. L., Tsai, L. & Stadtman, E. R. (1989). Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J Biol Chem* **264**: 3341-3346.

Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215-237.

Antonyuk, S. V., Melik-Adamyanyan, V. R., Popov, A. N., Lamzin, V. S., Hempstead, P. D., Harrison, P. M., Artymyuk, P. J. & Barynin, V. V. (2000). Three-dimensional structure of the enzyme dimanganese catalase from *Thermus thermophilus* at 1 angstrom resolution. *Crystal Reports* **45**: 105-116.

Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J. & Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6161-6165.

Avery, A. M. & Avery, S. V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **276**: 33730-33735.

Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C. & Toledano, M. B. (2003). Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic Biol Med* **35**: 889-900.

Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**: 20313-20316.

Biteau, B., Labarre, J. & Toledano, M. B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **425**: 980-984.

Bolwell, G. P. & Wojtaszek, P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathology* **51**: 347-366.

Brenot, A., King, K. Y. & Caparon, M. G. (2005). The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **55**: 221-234.

Brot, N., Weissbach, L., Werth, J. & Weissbach, H. (1981). Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 2155-2158.

Bsat, N., Chen, L. & Helmann, J. D. (1996). Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes. *J Bacteriol* **178**: 6579-6586.

Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. & Helmann, J. D. (1998). *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* **29**: 189-198.

Carmel-Harel, O., Stearman, R., Gasch, A. P., Botstein, D., Brown, P. O. & Storz, G. (2001). Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **39**: 595-605.

Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**: 527-605.

Chang, E. C. & Kosman, D. J. (1990). O₂-dependent methionine auxotrophy in Cu,Zn superoxide dismutase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **172**: 1840-1845.

Chang, S. H., Teshima, G. M., Milby, T., Gillece-Castro, B. & Canova-Davis, E. (1997). Metal-catalyzed photooxidation of histidine in human growth hormone. *Anal Biochem* **244**: 221-227.

Chen, L. & Helmann, J. D. (1995). *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps(PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene. *Mol Microbiol* **18**: 295-300.

Chen, L., James, L. P. & Helmann, J. D. (1993). Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions. *J Bacteriol* **175**: 5428-5437.

Chen, L., Keramati, L. & Helmann, J. D. (1995). Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8190-8194.

Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G. & Ryu, S. (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105**: 103-113.

Christman, M. F., Storz, G. & Ames, B. N. (1989). OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 3484-3488.

Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S. & Ames, B. N. (1985). Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**: 753-762.

Clay, M. D., Jenney, F. E., Jr., Noh, H. J., Hagedoorn, P. L., Adams, M. W. & Johnson, M. K. (2002). Resonance Raman characterization of the mononuclear iron active-site vibrations and putative electron transport pathways in *Pyrococcus furiosus* superoxide reductase. *Biochemistry* **41**: 9833-9841.

Collinson, L. P. & Dawes, I. W. (1995). Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase. *Gene* **156**: 123-127.

Costas, M., Mehn, M. P., Jensen, M. P. & Que, L., Jr. (2004). Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates. *Chem Rev* **104**: 939-986.

Crapo, J. D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J. W. & Chang, L. Y. (1992). Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10405-10409.

Culotta, V. C. (2000). Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Curr Top Cell Regul* **36**: 117-132.

Cunningham, B. C., Mulkerrin, M. G. & Wells, J. A. (1991). Dimerization of human growth hormone by zinc. *Science* **253**: 545-548.

Dean, R. T., Wolff, S. P. & McElligott, M. A. (1989). Histidine and proline are important sites of free radical damage to proteins. *Free Radic Res Commun* **7**: 97-103.

Delaunay, A., Isnard, A. D. & Toledano, M. B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J* **19**: 5157-5166.

Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J. & Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**: 471-481.

Demple, B. & Halbrook, J. (1983). Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* **304**: 466-468.

Dowds, B. C., Murphy, P., McConnell, D. J. & Devine, K. M. (1987). Relationship among oxidative stress, growth cycle, and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **169**: 5771-5775.

Ellis, H. R. & Poole, L. B. (1997). Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* **36**: 13349-13356.

Ellison, D. W. & Miller, V. L. (2006). Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Curr Opin Microbiol* **9**: 153-159.

Emerson, J. P., Coulter, E. D., Phillips, R. S. & Kurtz, D. M., Jr. (2003). Kinetics of the superoxide reductase catalytic cycle. *J Biol Chem* **278**: 39662-39668.

Farber, J. M. & Levine, R. L. (1986). Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. *J Biol Chem* **261**: 4574-4578.

Farquhar, E. R., Koehntop, K. D., Emerson, J. P. & Que, L. (2005). Post-translational self-hydroxylation: A probe for oxygen activation mechanisms in non-heme iron enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 230-239.

Farr, S. B. & Kogoma, T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol rev* **55**: 561-585.

- Farr, S. B., D'Ari, R. & Touati, D. (1986).** Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8268-8272.
- Finkel, T. (2000).** Redox-dependent signal transduction. *Febs Lett* **476**: 52-54.
- Finkel, T. (2003).** Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 247-254.
- Fridovich, I. (1978).** The biology of oxygen radicals. *Science* **201**: 875-880.
- Fridovich, I. (1989).** Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* **264**: 7761-7764.
- Fridovich, I. (1997).** Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* **272**: 18515-18517.
- Fuangthong, M. & Helmann, J. D. (2002).** The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6690-6695.
- Fuangthong, M. & Helmann, J. D. (2003).** Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 6348-6357.
- Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S. & Helmann, J. D. (2001).** OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 4134-4141.
- Fuangthong, M., Herbig, A. F., Bsat, N. & Helmann, J. D. (2002).** Regulation of the *Bacillus subtilis* fur and perR genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J Bacteriol* **184**: 3276-3286.
- Gaballa, A. & Helmann, J. D. (2002).** A peroxide-induced zinc uptake system plays an important role in protection against oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **45**: 997-1005.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. & Brown, P. O. (2000).** Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**: 4241-4257.
- Georgiou, G. (2002).** How to flip the (redox) switch. *Cell* **111**: 607-610.
- Getzoff, E. D., Tainer, J. A., Weiner, P. K., Kollman, P. A., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (1983).** Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **306**: 287-290.
- Goldstein, S. & Czapski, G. (1983).** Mechanisms of the dismutation of superoxide catalyzed by the copper(II) phenanthroline complex and of the oxidation of the copper(I) phenanthroline complex by oxygen in aqueous solution. *J Am Chem Soc* **105**: 7276 - 7280.
- Gonzalez-Flecha, B. & Demple, B. (1995).** Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**: 13681-13687.

Gonzalez-Flecha, B. & Demple, B. (1997). Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 382-388.

Gralla, E. B. & Valentine, J. S. (1991). Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol* **173**: 5918-5920.

Grant, C. M., Collinson, L. P., Roe, J. H. & Dawes, I. W. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Microbiol* **21**: 171-179.

Green, J. & Paget, M. S. (2004). Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* **2**: 954-966.

Hahn, J. S., Oh, S. Y., Chater, K. F., Cho, Y. H. & Roe, J. H. (2000). H₂O₂-sensitive fur-like repressor CatR regulating the major catalase gene in *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* **275**: 38254-38260.

Haldenwang, W. G. & Losick, R. (1979). A modified RNA polymerase transcribes a cloned gene under sporulation control in *Bacillus subtilis*. *Nature* **282**: 256-260.

Hausinger, R. P. (2004). FeII/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**: 21-68.

Hausladen, A., Privalle, C. T., Keng, T., DeAngelo, J. & Stamler, J. S. (1996). Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* **86**: 719-729.

Hecker, M. & Volker, U. (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* **44**: 35-91.

Hecker, M., Schumann, W. & Volker, U. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 417-428.

Helmann, J. D., Wu, M. F., Gaballa, A., Kobel, P. A., Morshedi, M. M., Fawcett, P. & Paddon, C. (2003). The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *J Bacteriol* **185**: 243-253.

Henle, E. S. & Linn, S. (1997). Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **272**: 19095-19098.

Herbig, A. F. & Helmann, J. D. (2001). Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* **41**: 849-859.

Hodgson, E. K. & Fridovich, I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* **14**: 5294-5299.

Hoffart, L. M., Barr, E. W., Guyer, R. B., Bollinger, J. M., Jr. & Krebs, C. (2006). Direct spectroscopic detection of a C-H-cleaving high-spin Fe(IV) complex in a prolyl-4-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 14738-14743.

Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* **54**: 237-271.

Holmgren, A. & Bjornstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* **252**: 199-208.

Hong, M., Fuangthong, M., Helmann, J. D. & Brennan, R. G. (2005). Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family. *Mol Cell* **20**: 131-141.

Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E. & Foster, S. J. (2001). PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**: 3744-3754.

Ikner, A. & Shiozaki, K. (2005). Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat Res* **569**: 13-27.

Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Ann Rev Microbiol* **57**: 395-418.

Imlay, J. A. & Fridovich, I. (1991). Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**: 6957-6965.

Isoyama, T., Murayama, A., Nomoto, A. & Kuge, S. (2001). Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. *J Biol Chem* **276**: 21863-21869.

Katona, G., Carpentier, P., Niviere, V., Amara, P., Adam, V., Ohana, J., Tsanov, N. & Bourgeois, D. (2007). Raman-assisted crystallography reveals end-on peroxide intermediates in a nonheme iron enzyme. *Science* **316**: 449-453.

Keyer, K. & Imlay, J. A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13635-13640.

Kim, S. O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W. F., Jr., Keng, T., DeAngelo, J., Hausladen, A. & Stamler, J. S. (2002). OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* **109**: 383-396.

King, K. Y., Horenstein, J. A. & Caparon, M. G. (2000). Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **182**: 5290-5299.

Kishigami, S., Akiyama, Y. & Ito, K. (1995). Redox states of DsbA in the periplasm of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **364**: 55-58.

Klomsiri, C., Panmanee, W., Dharmsthiti, S., Vattanaviboon, P. & Mongkolsuk, S. (2005). Novel roles of ohrR-ohr in *Xanthomonas* sensing, metabolism, and physiological adaptive response to lipid hydroperoxide. *J Bacteriol* **187**: 3277-3281.

Kono, Y. & Fridovich, I. (1983). Isolation and Characterization of the Pseudocatalase of *Lactobacillus-Plantarum* - a New Manganese-Containing Enzyme. *J Biol Chem* **258**: 6015-6019.

Krebs, C., Price, J. C., Baldwin, J., Saleh, L., Green, M. T. & Bollinger, J. M., Jr. (2005). Rapid freeze-quench ⁵⁷Fe Mossbauer spectroscopy: monitoring changes of an iron-containing active site during a biochemical reaction. *Inorg Chem* **44**: 742-757.

Krems, B., Charizanis, C. & Entian, K. D. (1995). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. *Curr Genet* **27**: 427-434.

Krems, B., Charizanis, C. & Entian, K. D. (1996). The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr Genet* **29**: 327-334.

Kuge, S. & Jones, N. (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *Embo J* **13**: 655-664.

Kuge, S., Jones, N. & Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J* **16**: 1710-1720.

Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y. & Nomoto, A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* **21**: 6139-6150.

Kullik, I., Toledano, M. B., Tartaglia, L. A. & Storz, G. (1995a). Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation. *J Bacteriol* **177**: 1275-1284.

Kullik, I., Stevens, J., Toledano, M. B. & Storz, G. (1995b). Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization. *J Bacteriol* **177**: 1285-1291.

Kurahashi, T., Miyazaki, A., Suwan, S. & Isobe, M. (2001). Extensive investigations on oxidized amino acid residues in H₂O₂-treated Cu,Zn-SOD protein with LC-ESI-Q-TOF-MS, MS/MS for the determination of the copper-binding site. *J Am Chem Soc* **123**: 9268-9278.

Lassmann, G., Eriksson, L. A., Himo, F., Lendzian, F. & Lubitz, W. (1999). Electronic structure of a transient histidine radical in liquid aqueous solution: EPR continuous-flow studies and density functional calculations. *J Phys Chem A* **103**: 1283-1290.

Lebovitz, R. M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Jr., Dionne, L., Lu, N., Huang, S. & Matzuk, M. M. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9782-9787.

Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G. & Ryu, S. E. (2004). Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1179-1185.

Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J. & Toledano, M. B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* **274**: 16040-16046.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006a). The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* **440**: 363-367.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006b). Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J Biol Chem* **281**: 23567-23578.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2007). Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**: 485-499.

Lee, J. W., Soonsanga, S. & Helmann, J. D. (2007). A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 8743-8748.

Lewisch, S. A. & Levine, R. L. (1995). Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis. *Anal Biochem* **231**: 440-446.

Loewen, P. C. (1984). Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of katE, a locus that affects catalase activity. *J Bacteriol* **157**: 622-626.

Lombard, M., Fontecave, M., Touati, D. & Niviere, V. (2000a). Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity. *J Biol Chem* **275**: 115-121.

Lombard, M., Touati, D., Fontecave, M. & Niviere, V. (2000b). Superoxide reductase as a unique defense system against superoxide stress in the microaerophile *Treponema pallidum*. *J Biol Chem* **275**: 27021-27026.

Mathe, C., Niviere, V. & Mattioli, T. A. (2005). Fe³⁺-hydroxide ligation in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* is associated with pH dependent spectral changes. *J Am Chem Soc* **127**: 16436-16441.

Mathe, C., Mattioli, T. A., Horner, O., Lombard, M., Latour, J. M., Fontecave, M. & Niviere, V. (2002). Identification of iron(III) peroxo species in the active site of the superoxide reductase SOR from *Desulfoarculus baarsii*. *J Am Chem Soc* **124**: 4966-4967.

McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969a). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-6055.

McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969b). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* **244**: 6056-6063.

McCord, J. M. & Fridovich, I. (1988). Superoxide dismutase: The first twenty years (1968–1988). *Free Radic Biol Med* **5**: 363-369.

Messner, K. R. & Imlay, J. A. (1999). The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**: 10119-10128.

Messner, K. R. & Imlay, J. A. (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem* **277**: 42563-42571.

Miller, A. F. (2004). Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol* **8**: 162-168.

Molina-Heredia, F. P., Houee-Levin, C., Berthomieu, C., Touati, D., Tremey, E., Favaudon, V., Adam, V. & Niviere, V. (2006). Detoxification of superoxide without production of H₂O₂: antioxidant activity of superoxide reductase complexed with ferrocyanide. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 14750-14755.

Mongkolsuk, S., Praituan, W., Loprasert, S., Fuangthong, M. & Chamnongpol, S. (1998). Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (ohr) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *J Bacteriol* **180**: 2636-2643.

Moore, C. M. & Helmann, J. D. (2005). Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* **8**: 188-195.

Moore, C. M., Nakano, M. M., Wang, T., Ye, R. W. & Helmann, J. D. (2004). Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *J Bacteriol* **186**: 4655-4664.

Morgan, B. A., Banks, G. R., Toone, W. M., Raitt, D., Kuge, S. & Johnston, L. H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **16**: 1035-1044.

Morrissey, J. A., Cockayne, A., Brummell, K. & Williams, P. (2004). The staphylococcal ferritins are differentially regulated in response to iron and manganese and via PerR and Fur. *Infect Immun* **72**: 972-979.

Moye-Rowley, W. S., Harshman, K. D. & Parker, C. S. (1989). Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev* **3**: 283-292.

Mukhopadhyay, P., Zheng, M., Bedzyk, L. A., LaRossa, R. A. & Storz, G. (2004). Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 745-750.

Mukhopadhyay, S. & Schellhorn, H. E. (1997). Identification and characterization of hydrogen peroxide-sensitive mutants of *Escherichia coli*: genes that require OxyR for expression. *J Bacteriol* **179**: 330-338.

Murphy, P., Dowds, B. C., McConnell, D. J. & Devine, K. M. (1987). Oxidative stress and growth temperature in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **169**: 5766-5770.

Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S. W., Rhee, S. G. & Stadtman, E. R. (1996). Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J Biol Chem* **271**: 15315-15321.

Niviere, V. & Fontecave, M. (2004). Discovery of superoxide reductase: an historical perspective. *J Biol Inorg Chem* **9**: 119-123.

Ookawara, T., Kawamura, N., Kitagawa, Y. & Taniguchi, N. (1992). Site-specific and random fragmentation of Cu,Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. Implication of reactive oxygen species. *J Biol Chem* **267**: 18505-18510.

Paget, M. S. & Buttner, M. J. (2003). Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* **37**: 91-121.

Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. & Vasil, M. L. (2003). Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**: 903-915.

Pomposiello, P. J., Bennik, M. H. & Demple, B. (2001). Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol* **183**: 3890-3902.

Poole, L. B. (1996). Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 2. Cystine disulfides involved in catalysis of peroxide reduction. *Biochemistry* **35**: 65-75.

Poole, L. B. & Ellis, H. R. (1996). Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins. *Biochemistry* **35**: 56-64.

Price, C. W., Fawcett, P., Ceremonie, H., Su, N., Murphy, C. K. & Youngman, P. (2001). Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **41**: 757-774.

Price, J. C., Barr, E. W., Glass, T. E., Krebs, C. & Bollinger, J. M., Jr. (2003a). Evidence for hydrogen abstraction from C1 of taurine by the high-spin Fe(IV) intermediate detected during oxygen activation by taurine:alpha-ketoglutarate dioxygenase (TauD). *J Am Chem Soc* **125**: 13008-13009.

Price, J. C., Barr, E. W., Tirupati, B., Bollinger, J. M., Jr. & Krebs, C. (2003b). The first direct characterization of a high-valent iron intermediate in the reaction of an alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase: a high-spin FeIV complex in taurine/alpha-ketoglutarate dioxygenase (TauD) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **42**: 7497-7508.

Pryor, W. A. (1986). Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes, and Reactions. *Ann Rev Phys* **48**: 657-667.

Purdy, D. & Park, S. F. (1994). Cloning, nucleotide sequence and characterization of a gene encoding superoxide dismutase from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microbiol* **140**: 1203-1208.

Rea, R., Hill, C. & Gahan, C. G. (2005). *Listeria monocytogenes* PerR mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8314-8322.

Rush, J. D. & Bielski, B. H. J. (1985). Pulse radiolytic studies of the reaction of perhydroxyl/superoxide O_2^- with iron(II)/iron(III) ions. The reactivity of HO_2/O_2^- with ferric ions and its implication on the occurrence of the Haber-Weiss reaction. *J Phys Chem* **89**: 5062-5066.

Ryle, M. J., Liu, A., Muthukumaran, R. B., Ho, R. Y., Koehntop, K. D., McCracken, J., Que, L., Jr. & Hausinger, R. P. (2003). O_2^- and alpha-ketoglutarate-dependent tyrosyl radical formation in TauD, an alpha-keto acid-dependent non-heme iron dioxygenase. *Biochemistry* **42**: 1854-1862.

Samuni, A. & Neta, P. (1973). Electron-Spin Resonance Study of Reaction of Hydroxyl Radicals with Pyrrole, Imidazole, and Related Compounds. *J Phys Chem* **77**: 1629-1635.

Sato, K., Akaike, T., Kohno, M., Ando, M. & Maeda, H. (1992). Hydroxyl radical production by H_2O_2 plus Cu,Zn-superoxide dismutase reflects the activity of free copper released from the oxidatively damaged enzyme. *J Biol Chem* **267**: 25371-25377.

Scandalios, J. G. (2002). Oxidative stress responses--what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol* **3**: reviews 1019.

Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* **38**: 995-1014.

Schnell, N., Krems, B. & Entian, K. D. (1992). The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr Genet* **21**: 269-273.

Schoneich, C. (2000). Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxo-histidine in peptides and proteins. *J Pharm Biomed Anal* **21**: 1093-1097.

Seaver, L. C. & Imlay, J. A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 7173-7181.

Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., Lee, T. H. & Rhee, S. G. (2000). Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* **275**: 20346-20354.

Skarstad, K., Steen, H. B. & Boye, E. (1985). *Escherichia coli* DNA distributions measured by flow cytometry and compared with theoretical computer simulations. *J Bacteriol* **163**: 661-668.

Stadtman, E. R. & Berlett, B. S. (1991). Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem* **266**: 17201-17211.

Stephen, D. W., Rivers, S. L. & Jamieson, D. J. (1995). The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **16**: 415-423.

Storz, G. & Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Curr Op Microbiol* **2**: 188-194.

Storz, G., Tartaglia, L. A. & Ames, B. N. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**, 189-194.

Sukchawalit, R., Loprasert, S., Atichartpongkul, S. & Mongkolsuk, S. (2001). Complex regulation of the organic hydroperoxide resistance gene (ohr) from *Xanthomonas* involves OhrR, a novel organic peroxide-inducible negative regulator, and posttranscriptional modifications. *J Bacteriol* **183**: 4405-4412.

Tao, K. (1997). oxyR-dependent induction of *Escherichia coli* grx gene expression by peroxide stress. *J Bacteriol* **179**: 5967-5970.

Tao, K. (1999). *In vivo* oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **457**: 90-92.

Tartaglia, L. A., Storz, G., Brodsky, M. H., Lai, A. & Ames, B. N. (1990). Alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. Sequence and homology to thioredoxin reductase and other flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem* **265**: 10535-10540.

Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L. & Tacnet, F. (2004). Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* **29**: 351-357.

Toledano, M. B., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P. T., Schneider, T. D. & Storz, G. (1994). Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell* **78**: 897-909.

Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D. & Flohe, L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* **252**: 38-53.

van Vliet, A. H., Baillon, M. L., Penn, C. W. & Ketley, J. M. (1999). *Campylobacter jejuni* contains two fur homologs: characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR repressor. *J Bacteriol* **181**: 6371-6376.

Veal, E. A., Ross, S. J., Malakasi, P., Peacock, E. & Morgan, B. A. (2003). Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J Biol Chem* **278**: 30896-30904.

Voelker, U., Luo, T., Smirnova, N. & Haldenwang, W. (1997). Stress activation of *Bacillus subtilis* sigma B can occur in the absence of the sigma B negative regulator RsbX. *J Bacteriol* **179**: 1980-1984.

Weisiger, R. A. & Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* **248**: 4793-4796.

Wemmie, J. A., Wu, A. L., Harshman, K. D., Parker, C. S. & Moye-Rowley, W. S. (1994). Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance. *J Biol Chem* **269**: 14690-14697.

Wicar, S., Mulkerrin, M. G., Bathory, G., Khundkar, L. H. & Karger, B. L. (1994). Conformational changes in the reversed phase liquid chromatography of recombinant human growth hormone as a function of organic solvent: the molten globule state. *Anal Chem* **66**: 3908-3915.

Wiggerich, H. G. & Puhler, A. (2000). The exbD2 gene as well as the iron-uptake genes tonB, exbB and exbD1 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* are essential for the induction of a hypersensitive response on pepper (*Capsicum annuum*). *Microbiol* **146**: 1053-1060.

Wilmot, C. M. (2007). Biochemistry. An ancient and intimate partnership. *Science* **316**: 379-380.

Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K. S., Kang, S. W., Kim, K. & Rhee, S. G. (2003). Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* **300**: 653-656.

Woo, H. A., Jeong, W., Chang, T., Park, K. J., Park, S. J., Yang, J. S. & Rhee, S. G. (2005). Reduction of Cysteine Sulfinic Acid by Sulfiredoxin Is Specific to 2-Cys Peroxiredoxins. *J Biol Chem* **280**: 3125-3128.

Wood, M. J., Andrade, E. C. & Storz, G. (2003a). The redox domain of the Yap1p transcription factor contains two disulfide bonds. *Biochemistry* **42**, 11982-11991.

Wood, M. J., Storz, G. & Tjandra, N. (2004). Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* **430**: 917-921.

Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R. & Karplus, P. A. (2002). Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* **41**: 5493-5504.

Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J. & Poole, L. B. (2003b). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28**: 32-40.

Yan, C., Lee, L. H. & Davis, L. I. (1998). Crmlp mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *Embo J* **17**: 7416-7429.

Yeh, A. P., Hu, Y., Jenney, F. E., Jr., Adams, M. W. & Rees, D. C. (2000). Structures of the superoxide reductase from *Pyrococcus furiosus* in the oxidized and reduced states. *Biochemistry* **39**: 2499-2508.

Yim, M. B., Chock, P. B. & Stadtman, E. R. (1993). Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *J Biol Chem* **268**: 4099-4105.

Youn, H. D., Youn, H., Lee, J. W., Yim, Y. I., Lee, J. K., Hah, Y. C. & Kang, S. O. (1996). Unique isozymes of superoxide dismutase in *Streptomyces griseus*. *Arch Biochem Biophys* **334**: 341-348.

Zhao, F., Ghezzi-Schoneich, E., Aced, G. I., Hong, J., Milby, T. & Schoneich, C. (1997). Metal-catalyzed oxidation of histidine in human growth hormone. Mechanism, isotope effects, and inhibition by a mild denaturing alcohol. *J Biol Chem* **272**: 9019-9029.

Zheng, M. & Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol* **59**: 1-6.

Zheng, M., Aslund, F. & Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**: 1718-1721.

Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A. & Storz, G. (2001a). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**: 4562-4570.

Zheng, M., Wang, X., Doan, B., Lewis, K. A., Schneider, T. D. & Storz, G. (2001b). Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 4571-4579.

Résultats

Chapitre I

Purification et caractérisation de PerR de *Bacillus subtilis*.

La protéine PerR de *Bacillus subtilis* a été obtenue à partir d'une souche BL21(DE3) d'*E. coli* surproductrice. Dans un premier temps, elle a été purifiée sous forme d'apo-protéine selon le protocole décrit par Helmann *et al.* (Herbig & Helmann, 2001). Ce protocole a ensuite été largement modifié afin d'obtenir un lot de protéine plus homogène, en terme d'oxydation de certains résidus.

I. Protocole de purification de PerR.

1) Obtention des extraits protéiques

La protéine PerR de *B. subtilis* a été surexprimée à l'aide d'un système inductible à l'IPTG. Le gène *perr* a été cloné dans un plasmide pET-30c où il est sous le contrôle d'un promoteur reconnu par l'ARN polymérase T7. Ce plasmide contient un gène de résistance à la kanamycine. Il a été introduit par choc thermique dans une souche BL21(DE3) d'*E. coli* qui synthétise l'ARN polymérase sous contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. Ce système permet d'obtenir entre 15 et 20 mg de protéine dimère pour 1 litre de culture à l'issue de la purification. Différents essais ont permis de mettre au point un protocole en deux étapes. Le gel d'électrophorèse d'échantillons prélevés au cours des différentes étapes de purification est représenté sur la figure I.1.

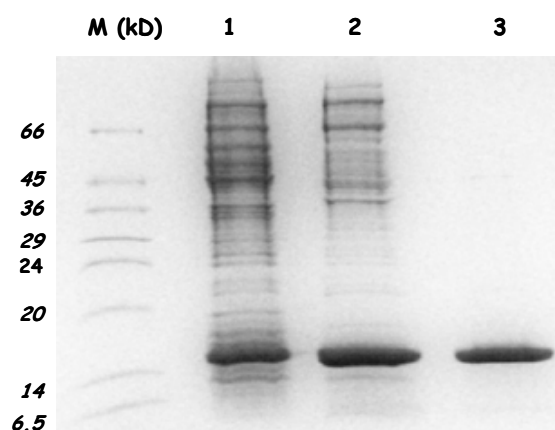


Figure I.1 : analyse électrophorétique en conditions dénaturantes de l'extrait brut (1), de la protéine purifiée : après passage sur colonne échangeuse d'anions Q-sepharose (2), puis passage sur colonne de filtration sur gel (3). Après séparation sur gel d'acrylamide 15% (v/v), les protéines sont révélées au bleu de Coomassie R-250. Un marqueur de taille est noté en kDa sur la gauche de la figure.

2) Purification par chromatographie d'affinité

La première étape de purification est basée sur une colonne échangeuse d'anions de type Q-sepharose. Avec ce type de colonne, les protéines se fixent par affinité électrostatique à des groupements chargés de la résine. Une résine portant des groupements positifs est dite "échangeuse d'anions", parce que des anions ou les groupements carboxylates d'une protéine peuvent interagir avec elle. Un gradient salin permet de séparer les protéines selon leur degré de charge positive ou négative (Figure I.2). À l'inverse de ce qui se passe en électrophorèse, ici, ce n'est pas la charge nette de la protéine qui compte mais la capacité de ses résidus chargés d'interagir avec la résine. Dans le cas de la protéine PerR, les extraits protéiques sont chargés sur la colonne dans un tampon Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM (tampon A) puis élués avec un gradient en sels (tampon A avec une concentration en NaCl de 1 M noté tampon B). La force ionique augmente progressivement ce qui permet un décrochage progressif des différentes protéines contenues dans les extraits cellulaires. La protéine PerR est éluée lorsque le pourcentage de tampon B est compris entre 20 et 30%. Les fractions contenant la protéine sont récupérées, précipitées au sulfate d'ammonium et purifiées par filtration sur gel.

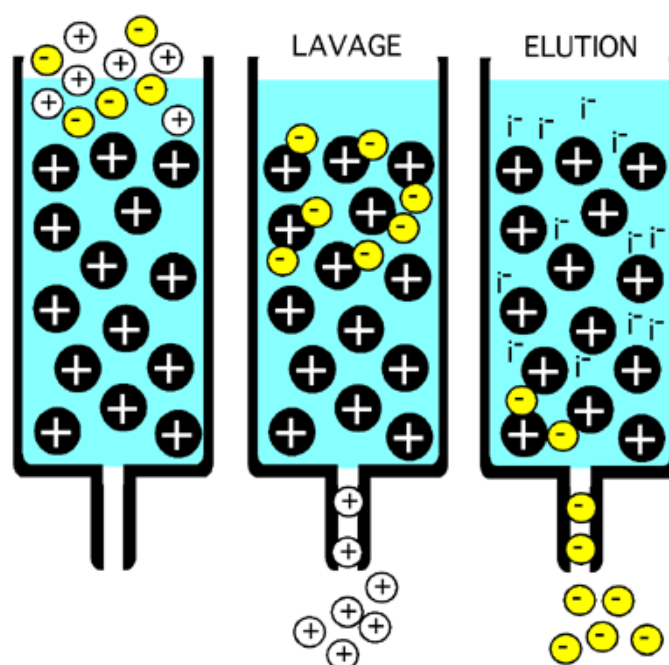


Figure I.2 : principe de la colonne de chromatographie d'affinité. La première étape consiste à « charger » la colonne en matériel issu de l'extraction cellulaire. Ensuite un premier lavage permet d'éliminer les composants non retenus par la colonne. Enfin, en augmentant la force ionique, il y a décrochage progressif des éléments retenus par la colonne.

3) Purification par filtration sur gel

Cette dernière étape est réalisée sur une colonne Superdex 75 préparative (résolutive entre 5000 Da et 70000 Da). Le processus de séparation par chromatographie d'exclusion sur gel est basé sur la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire et de leur taille. Une colonne de chromatographie pour filtration sur gel est remplie d'une résine formée de billes creuses et poreuses. La taille des pores est telle que les petites protéines passent à travers alors que les plus grosses ne peuvent pas entrer et ne sont pas retenues (Figure I.3). Les protéines de plus haut poids moléculaire sortent en premier de la colonne. Les plus petites sont retardées par leurs interactions avec les billes et elles sont donc les dernières à quitter la colonne. Cette technique est très efficace mais nécessite une forte concentration et un faible volume de matériel de départ afin que les protéines ne s'étalent pas le long de la colonne. Ceci réduirait la qualité de la séparation. Cette colonne est généralement utilisée en fin de protocole après une précipitation des échantillons au sulfate d'ammonium.

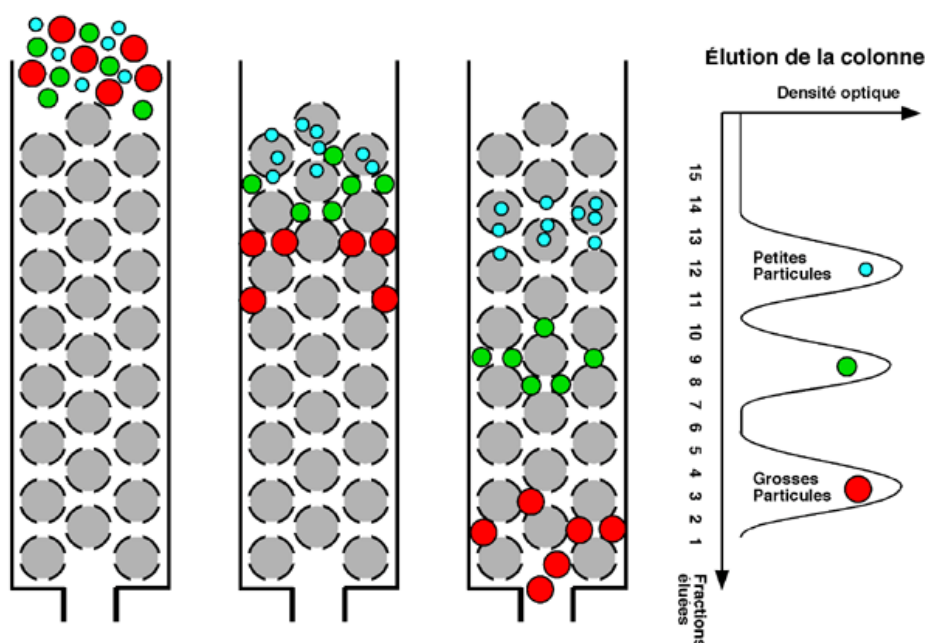


Figure I.3 : principe de la colonne de filtration sur gel. Les grosses particules ont moins de chemin à parcourir et sortent donc en premier alors que les petites passent à travers les pores et voient leur chemin prolongé.

Le résultat de la purification est visible sur un chromatogramme où le volume d'élution est inversement proportionnel à la taille des protéines. Les protéines peuvent ainsi être séparées en fonction de leur taille. La figure I.4 présente un profil d'élution obtenu au

cours de cette dernière étape de purification. Le tampon utilisé est un tampon Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 250 mM. Afin d'éliminer toute trace éventuelle de contaminants métalliques, ce tampon est préalablement traité par une résine Chelex-100 (Biorad).

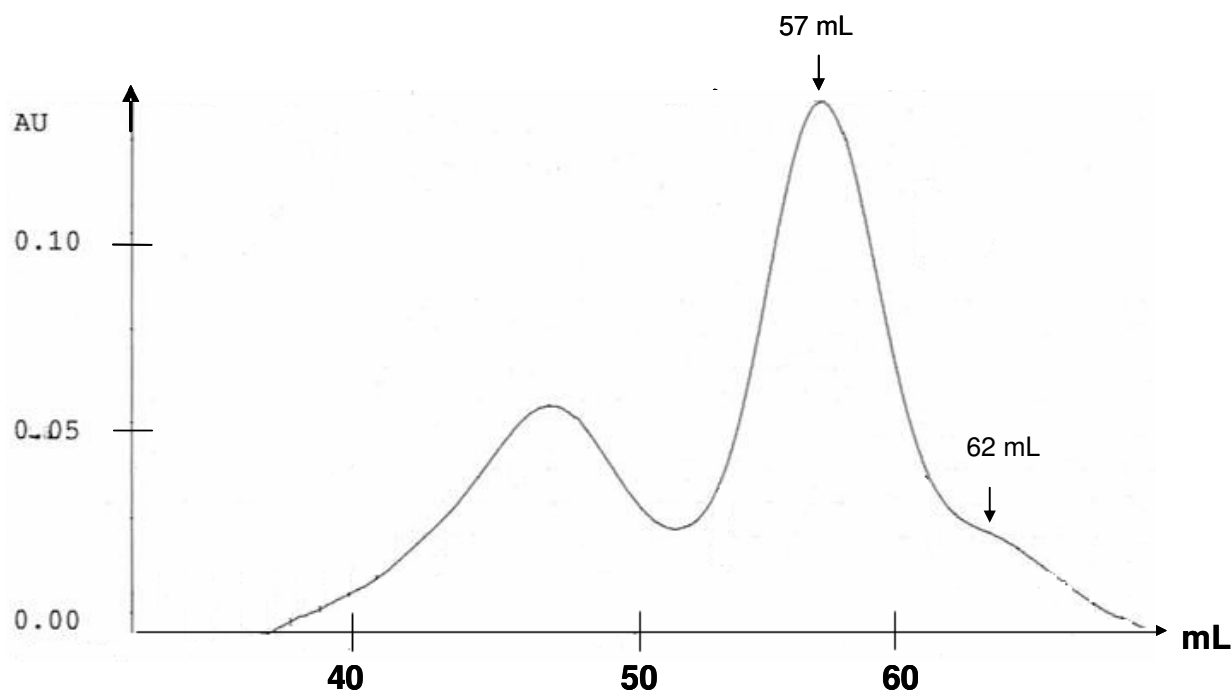


Figure I.4 : profil d'élution de filtration sur gel des fractions contenant PerR issues de la colonne Q-sepharose.

La protéine PerR pure est présente essentiellement dans le pic à 57 mL et également dans l'épaule à 62 mL. Le premier pic à 57 mL correspond au poids moléculaire de la forme dimère, très majoritaire, de la protéine en solution. Le petit épaule à 62 mL correspond à la forme monomère de la protéine. Le pic observé à 47 mL correspond à des formes oligomères de PerR et à des impuretés de plus haut poids moléculaire.

Ce mode opératoire conduit donc en grande partie à une protéine PerR pure et homogène sous forme de dimère d'environ 32 kDa (Figure I.1 ligne 3).

4) Détermination du coefficient d'extinction molaire de PerR

Le coefficient d'extinction molaire de la protéine a été déterminé par dosage des acides aminés. Cette méthode est basée sur la réactivité du groupement α -aminé libre des acides aminés avec un réactif spécifique appelé la ninhydrine. Celui-ci va former en présence de protéines un composé bleu qui absorbe à la longueur d'onde de 570 nm facilement

déTECTABLE et quantifiable. Le coefficient d'extinction molaire de PerR à 277 nm ainsi déterminé est égal à $9020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5) Contenu en métal de la protéine

L'analyse par spectrométrie d'absorption atomique sur plasma des échantillons ainsi purifiés a permis de mettre en évidence la présence de 0,8 (+/- 0,05) atomes de zinc par monomère. Au cours de la purification de la protéine, aucun métal n'est ajouté. La présence de zinc dans l'échantillon suggère que PerR présente une forte affinité pour ce métal. En effet, les tampons d'extraction et de début de purification contiennent de l'EDTA qui est un chélateur présentant une forte affinité pour les métaux divalents. Si le zinc était faiblement lié à la protéine alors celui-ci aurait été complexé par l'EDTA.

Les différents lots de protéine ne présentent aucune trace de fer ou de manganèse qui sont les deux métaux qui peuvent être présents, *in vivo*, au sein du site de régulation. Ce protocole de purification conduit donc à une forme apo de la protéine PerR notée PerR-Zn.

Afin de vérifier la pureté des échantillons et l'intégrité de la protéine, celle-ci est caractérisée en spectrométrie de masse.

II. Caractérisation en spectrométrie de masse.

1) Description des techniques utilisées

La spectrométrie de masse est un outil puissant pour la caractérisation des protéines. Le principe général de la spectrométrie de masse repose sur une ionisation du matériel et au « voyage » du matériel chargé vers un détecteur. On distingue plusieurs systèmes de spectrométrie de masse selon la technique d'ionisation et la technique de détection. Aujourd'hui, les principales sources d'ionisation utilisées pour l'analyse des protéines sont de type MALDI (**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption **I**onisation) ou de type ESI (**E**lectrospray **I**onisation). Différents types d'analyseurs peuvent être adaptés à ces sources : des analyseurs à temps de vol (TOF, **T**ime **O**f **F**light), des analyseurs quadripolaires, des trappes ioniques, des analyseurs à résonance cyclotronique ou encore à secteur magnétique. Dans le cadre de notre

travail, les appareils qui ont été utilisés sont un Electrospray-Q-TOF micro (Micromass, UK) pour déterminer la masse de la protéine entière et un MALDI-TOF (voyager Elite, Perspective) pour identifier les fragments de la protéine issus d'une digestion trypsique. Nous décrirons ici brièvement les deux types d'ionisation ainsi que le système de détection TOF.

- *l'ionisation de type ESI :*

L'échantillon est soumis à un fort champ électrique pour ioniser les molécules. Celles-ci sont ensuite nébulisées dans la chambre d'ionisation sous la forme de microgouttes pleines d'ions, gouttes qui sont rapidement déshydratées par un courant de gaz chauffé (il s'agit le plus souvent d'azote). Le solvant disparaissant, les ions de même charge dans une goutte se repoussent, la faisant exploser en plusieurs gouttelettes plus petites. Le processus se répète jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de solvant du tout, laissant des ions "nus" dans les airs. Les charges sont distribuées sur les peptides de façon statistique; un même peptide peut en porter plusieurs. Un séchage plus rapide des gouttelettes favorise la multi-ionisation. Une spectrométrie de masse utilisant l'ESI présente souvent ses résultats sous forme de masse/charge (m/z) pour présenter la proportion des différentes formes chargées d'un même peptide.

- *l'ionisation de type MALDI :*

Dans ce cas, l'échantillon est d'abord associé à une matrice (par exemple, l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique) de telle façon que chaque molécule de peptide soit séparée de ses voisines. Les peptides et la matrice doivent former un mélange dont tout le liquide a été retiré. L'échantillon est ensuite irradié par un rayon laser. L'énergie du laser cause la désorption de certains peptides qui sont alors expulsés. Ces réactions d'ionisation ont lieu pendant les premières dizaines de nanosecondes après l'irradiation au laser. Les ions sont ensuite accélérés vers le détecteur.

- *le détecteur TOF :*

Cette technique prend en considération le temps que met un ion pour parcourir le chemin de la chambre d'ionisation au détecteur. Les ions plus gros mettent plus de temps que les plus petits. Elle ne semble pas limitée par la taille des ions et est extrêmement précise. Elle est

souvent combinée avec une méthode d'ionisation rapide comme le MALDI, qui permet de savoir exactement quand les particules ont pris leur envol grâce à la rapidité du processus MALDI.

2) Protéine entière

La séquence d'acides aminés de PerR, dérivée de la séquence d'acides nucléiques, comprend 145 résidus qui constituent un polypeptide de 16423,5 Da.

<u>A.A.</u>		<u>A.A.</u>	
Asp/Asn	13	Met	3
Thr	8	Ile	6
Ser	8	Leu	12
Glu/Gln	17	Tyr	7
Pro	4	Phe	6
Gly	8	His	10
Ala	12	Lys	9
Cys	4	Arg	6
Val	12		

Figure I.5 : composition en acides aminés de PerR de *B. subtilis*.

L'analyse en spectrométrie de masse électrospray de la protéine entière indique que celle-ci est présente sous plusieurs formes à l'issue de la purification. Le spectre d'une solution d'apoprotéine PerR-Zn dans un tampon acétate d'ammonium 25 mM est représenté sur la figure I.6.

Deux espèces, dont les proportions respectives varient selon les lots de purification, sont obtenues. Une première espèce d'un poids moléculaire de 16292 Da correspondant à une forme notée A de PerR est observée. Cette forme présente un défaut de masse de 131 Da par rapport à la masse théorique calculée d'après la séquence d'acides aminés (P.M. théorique 16423,5 Da). En effet, *E. coli* possède un système enzymatique excisant le résidu méthionine toujours présent en position N-terminale des protéines exprimées chez les procaryotes. La

forme A correspond donc à la protéine entière sans la méthionine N-terminale. Cependant, une seconde forme notée B, dont le poids moléculaire est de 16308 Da, est également obtenue. Cette forme correspond à un adduit de 16 Da par rapport à la forme A. Il s'agit très probablement d'une oxydation sur l'un des acides aminés de PerR (addition d'un atome d'oxygène). La nature de cette oxydation a été déterminée et les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre V des résultats.

Le pourcentage des formes A et B est variable d'un lot de protéine à l'autre. Une observation complémentaire est qu'en conditions dénaturantes non réductrices, aucune espèce avec un poids moléculaire correspondant à la forme dimère n'a été observée. La présence d'un pont disulfure entre les deux monomères peut ainsi être exclue. Dans le but de déterminer la localisation de l'oxydation et son impact potentiel sur les propriétés biochimiques de la protéine, des digestions peptidiques (essentiellement à la trypsine) ont été réalisées.

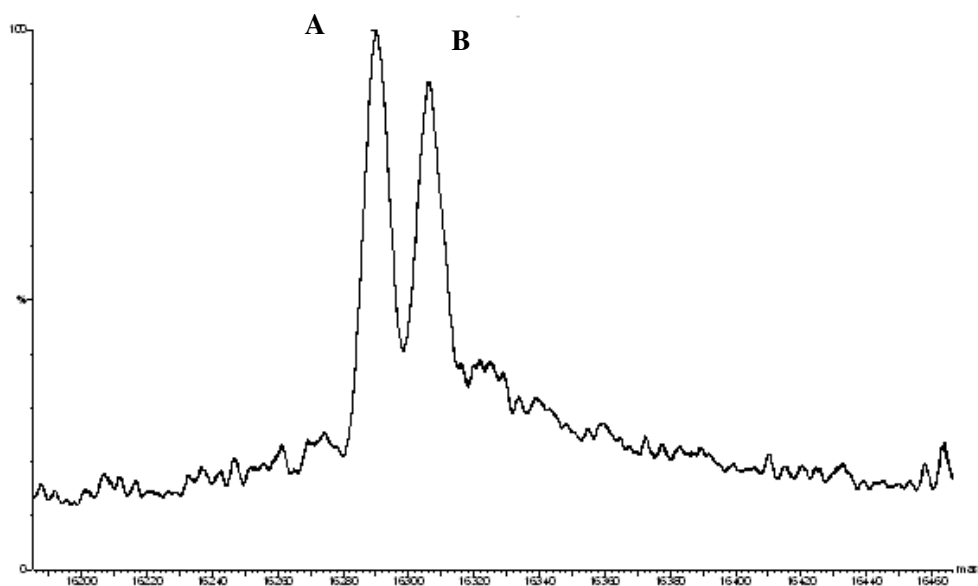


Figure I.6 : spectre de masse reconstruit de l'apo-PerR-Zn.

3) Digestion trypsique

- *Fragments attendus :*

La trypsine est une protéase qui clive les protéines après chaque résidu lysine et arginine. La digestion tryptique d'une protéine aboutit donc à une carte peptidique qui correspond aux différents fragments spécifiques de cette protéine. Les fragments issus de la digestion de PerR sont présentés dans la figure I.7.

Masse (Da)	Position	Séquence peptidique
2585.3034	102-124	IVDFHYPGLDEVEQLAAHVTGFK
2401.1856	25-45	HAILEYLVNSMAHPTADDIYK
2085.8793	84-101	FDFVTSDHYHAICENCGK
1625.8104	51-64	FPNMSVATVYNNLR
1371.6283	130-141	LEIYGVCQECSK
1098.5062	74-83	ELTYGDASSR
803.4509	8-14	EALETLK
668.4131	2-7	AAHELK
635.3372	125-129	VSHHR
632.3613	68-73	ESGLVK
614.3620	20-24	ITPQR
561.2991	15-19	ETGVR
517.2980	46-50	ALEGK
421.2558	65-67	VFR
399.1623	143-145	ENH
147.1128	142-142	K

Figure I.7 : fragments issus de la digestion tryptique de la protéine PerR de B. subtilis.

- *Fragments obtenus :*

Le produit de digestion de PerR (mélange forme A et B) par la trypsine est analysé en spectrométrie de masse MALDI-TOF. Seuls les fragments dont la masse est supérieure à 800 Da sont détectés, les fragments de masse plus petite sortent avec la matrice et ne sont pas détectés. Le spectre de masse après digestion est présenté figure I.8.

Ce spectre indique que l'addition d'un atome d'oxygène ne se fait pas sur un seul peptide. En effet, deux fragments présentent un gain de 16 Da : le fragment I contenant les résidus 84-101 (2085 et 2101 Da) et le fragment II contenant les résidus 25-45 (2401 et 2417 Da).

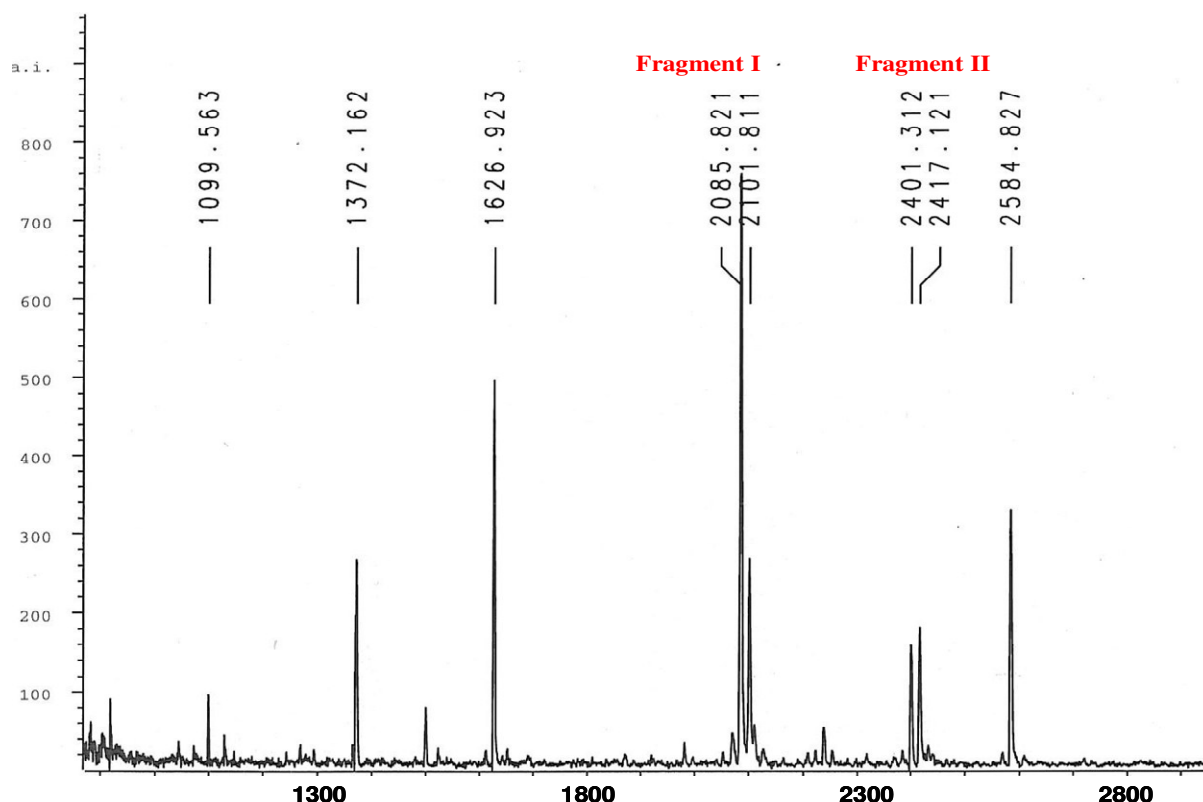


Figure 1.8 : spectre de masse de la digestion trypsique de la protéine PerR.

Le fragment I présente deux résidus histidine en positions 91 et 93. Le fragment II contient deux résidus histidine (positions 25 et 37) et un résidu méthionine (position 35). Il est décrit dans la littérature (Stadtman, 1990) que les résidus histidine et méthionine sont susceptibles de s'oxyder respectivement en 2-oxo-histidine et méthionine sulfoxyde. Le produit d'oxydation présente alors une augmentation de masse de 16 Da. L'incrément de 16 Da sur la masse globale de la protéine PerR suggère une oxydation partielle des résidus des fragments I et II.

Il faut noter que, parmi ces cinq résidus, les trois histidines 37, 91 et 93 sont potentiellement impliquées dans la coordination du métal régulateur (Lee & Helmann, 2006a). Par ailleurs, Lee et Helmann ont montré que les histidines 37 et 91 sont oxydées lors de la réaction de PerR avec H_2O_2 . L'analyse en spectrométrie de masse d'un échantillon issu de purification suggère donc que, dans les conditions d'expression et de purification, la protéine PerR peut s'oxyder au niveau de son site de régulation. Ce point particulier sera discuté dans le chapitre V de ce manuscrit.

Le groupe d'Helmann avance l'hypothèse qu'une protéine oxydée au niveau du site actif ne fixe pas le métal de régulation. Cette hypothèse est indirectement soutenue par des

expériences de mutagenèse dirigée et de retard sur gel. La mutation ponctuelle d'un des cinq résidus potentiels du site de régulation conduit à une protéine incapable de fixer l'ADN en présence de Mn^{2+} (Lee & Helmann, 2006a). Ce simple test d'activité est basé sur le principe que la protéine PerR qui fixe un métal régulateur peut se lier à sa séquence d'ADN cible. L'hypothèse d'Helmann est également confortée par le fait qu'une protéine oxydée, *in vivo*, ne joue plus son rôle de répresseur de la transcription (Lee & Helmann, 2006a).

Cependant, à ce jour, les données biochimiques sur la protéine PerR ne permettent pas de relier directement l'oxydation du site actif et la capacité de cette protéine à fixer le métal régulateur (Mn^{2+} ou Fe^{2+}). Au cours de ces travaux, nous avons donc cherché à relier directement l'oxydation de la protéine et l'incorporation du métal de régulation. Pour cela, nous avons utilisé la spectroscopie RPE et les propriétés de l'ion Mn^{2+} lors des expériences de métallation. Cette méthode nous a, en outre, permis d'estimer le pourcentage de forme active (ou activable) des différents échantillons issus de purification.

III. Métallation de PerR par l'ion Mn^{2+} .

Nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'ion Mn^{2+} et l'ion Fe^{2+} peuvent, *in vivo* et *in vitro*, être complexés par PerR au niveau du site de régulation et conduire à une forme active de la protéine. L'ion Mn^{2+} est, par ailleurs, beaucoup moins sensible à l'oxydation que l'ion Fe^{2+} , ce qui permet d'étudier la métallation de la protéine sans être à l'abri de l'air. Dans un premier temps, la métallation de PerR a été analysée par spectrométrie d'absorption atomique. La protéine a été incubée en présence d'un excès de Mn^{2+} puis un échange de tampon est réalisé afin de doser le métal effectivement lié par la protéine. Ces expériences ont montré que PerR incorporait un nombre variable d'équivalent de Mn^{2+} allant de 0,1 à 0,8 équivalent par monomère selon les différents lots de protéine.

Dans un deuxième temps, les expériences de métallation ont été suivies en RPE grâce aux propriétés spectroscopiques du manganèse. Les résultats obtenus sont présentés dans ce paragraphe après une brève présentation de la technique.

1) RPE de l'ion Mn^{2+}

Le manganèse peut être présent dans les protéines sous trois états d'oxydation : II, III et IV, l'état d'oxydation II étant le plus commun à pH 7. C'est un ion $3d^5$ (6S), de symétrie sphérique. Les complexes du Mn(II) sont généralement de configuration haut-spin et de coordination 6 avec des ligands de type N/O. L'ion Mn(II) échange rapidement ses ligands avec H_2O , ce qui donne des constantes d'affinité relativement faibles du métal pour les sites des protéines.

L'ion Mn(II) haut-spin $S = 5/2$ possède un état fondamental représenté par le terme $^6A_{1g}$ en symétrie octaédrique. Cet état est totalement symétrique et ne présente pas de multiplicité orbitale ($L = 0$), donc pas de couplage spin-orbite au premier ordre.

Si le système est placé dans un champ magnétique, l'effet de celui-ci est de lever la dégénérescence des niveaux de spin électroniques ($M_s = \pm 5/2, \pm 3/2, \pm 1/2$), c'est l'effet Zeeman électronique. Le spectre RPE est alors formé par 5 transitions quasi-superposées constituant une seule raie centrée vers $g = 2$ (Figure I.9A). La complexité du système est liée au spin nucléaire de ^{55}Mn , $I = 5/2$, qui interagit avec le spin électronique et engendre une structure hyperfine constituée de 6 raies ($2I + 1$) régulièrement espacées et de même intensité.

La présence d'un champ de ligands de faible symétrie peut générer un phénomène d'écart en champ nul donnant naissance à trois doublets de Kramers ; dans un champ magnétique les dégénérescences restantes sont levées et 5 transitions permises ($\Delta M_s = \pm 1$) peuvent être observées sur le spectre RPE (Figure I.9B). L'effet du couplage hyperfin peut rediviser chacune des cinq raies en six. Les écarts en champ nul sont généralement faibles, de l'ordre de 10^{-2} cm^{-1} (Abragam & Bleaney, 1970). Les transitions externes $\pm 5/2 \leftrightarrow \pm 3/2$ et $\pm 3/2 \leftrightarrow \pm 1/2$ ne sont souvent pas visibles lorsque le Mn(II) est lié à une protéine car elles sont de faible intensité. Néanmoins, la transition centrale ($- 1/2 \rightarrow + 1/2$) est pratiquement isotrope et donne un signal intense centré à $g = 2$ avec une structure hyperfine de 6 raies (Whiting *et al.*, 1996).

Cependant à température ambiante, le système en solution fluide se comporte de façon quasi-isotrope. De par les mouvements existant à cette température, le phénomène d'éclatement en champ nul est moyenné à zéro et le spectre détecté est uniquement contrôlé par les effets Zeeman et hyperfin qui sont isotropes. On observe donc, conformément à la figure I.9A, une seule raie Zeeman éclatée sous l'action de l'interaction avec le spin nucléaire du manganèse en six raies régulièrement espacées et de même intensité.

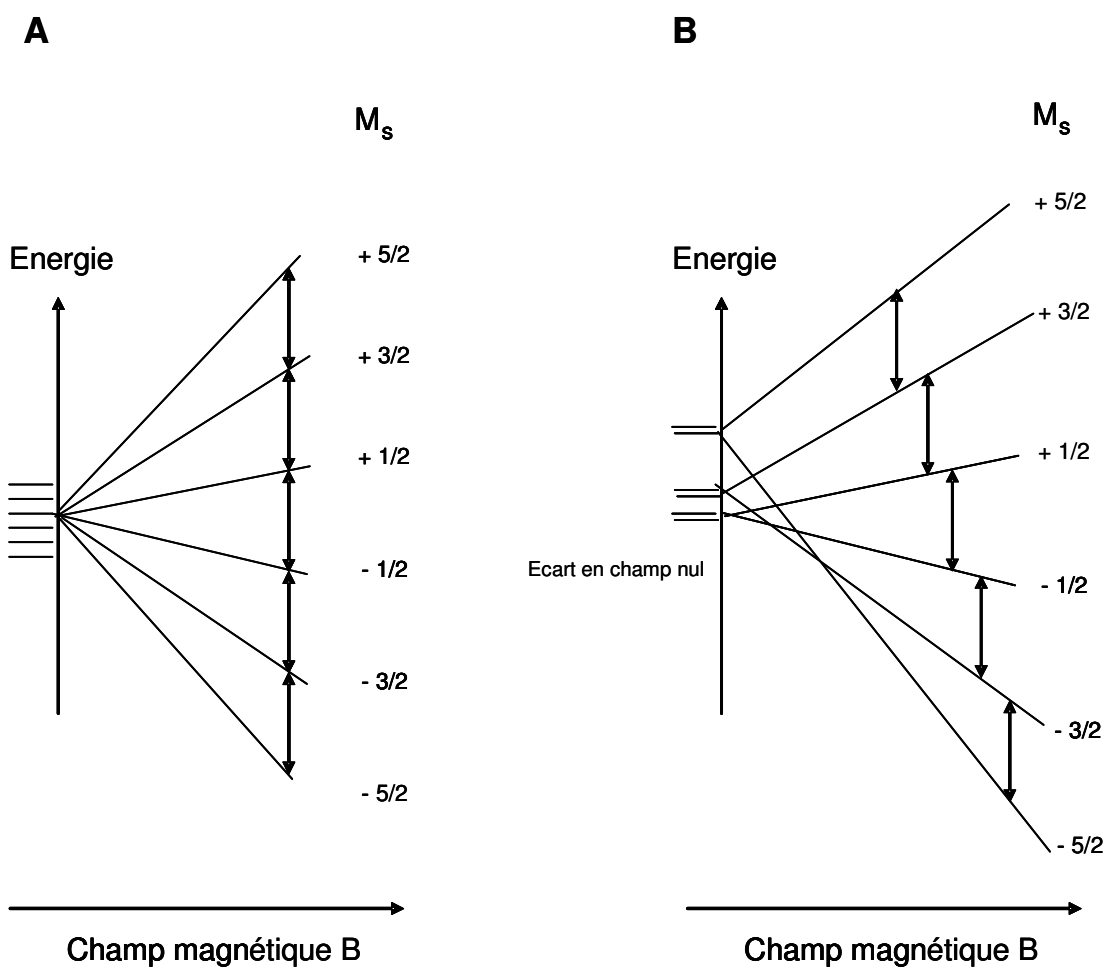


Figure 1.9 : niveaux d'énergie pour un ion Mn(II) haut-spin d^5 dans un champ magnétique. (A) Effet Zeeman électronique (B) Ecart en champ nul + effet Zeeman (dans les deux cas sans considérer le couplage hyperfin afin de simplifier la figure).

2) Dosage du site métallique

PerR est purifiée sous forme d'apoprotéine PerR-Zn. La spectrométrie de masse a révélé que cette protéine est en partie oxydée et que cette oxydation est probablement localisée au niveau de résidus histidine impliqués dans la liaison du métal de régulation. La capacité de cette protéine à fixer l'ion Mn^{2+} a été suivie par spectroscopie RPE à température ambiante. Ces expériences devraient nous permettre, comme nous l'avons noté précédemment, de relier le taux d'oxydation de PerR au taux d'incorporation de Mn^{2+} .

- Principe général :

Ce type d'expérience est basé sur le fait que l'ion Mn^{2+} en solution aqueuse et l'ion lié à la protéine ont des spectres différents. Alors que l'ion Mn^{2+} en solution à température ambiante présente un spectre caractéristique à 6 raies, l'immobilisation de l'ion Mn^{2+} à l'intérieur du site de la protéine produit un fort élargissement du signal qui devient quasiment indétectable dans ces conditions de température. Cette méthode est générale et a souvent été utilisée afin de titrer les sites métalliques dans plusieurs protéines comme la ribonucléotide réductase (Atta *et al.*, 1992).

Cet élargissement du signal du complexe Mn^{2+} -protéine en solution peut être attribué soit à un élargissement inhomogène résultant du caractère d'état solide de l'échantillon conféré par le temps de corrélation rotationnel relativement long de la protéine, soit à un élargissement homogène causé par la diminution du temps de relaxation longitudinal T_1 de l'ion Mn^{2+} au sein de la protéine (Hamed & Neilands, 1994; Reed & Cohn, 1970). En effet, la principale contribution à la largeur de raie provient du temps de relaxation T_1 . Lorsque celui-ci est très court, la raie de résonance est fortement élargie et peut devenir non détectable à température ambiante. C'est pour cette raison que les très basses températures sont souvent requises pour observer les spectres RPE des ions des métaux de transition. Ainsi l'absence d'un signal RPE peut être indicative d'un ion Mn^{2+} fortement lié au sein de la protéine. Cependant, dans le cas du manganèse, cette absence peut être également due à un ion Mn^{3+} ($S = 2$) silencieux en RPE.

- Spectre de l'ion Mn^{2+} en solution aqueuse:

Le spectre RPE du complexe $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ enregistré à température ambiante (Figure I.10) présente les six raies caractéristiques de l'ion Mn^{2+} haut-spin $S = 5/2$ autour de $g = 2$, correspondant à des transitions permises par la règle de sélection $\Delta M_s = \pm 1$, $\Delta M_I = 0$. Ces six raies hyperfines résultent de l'interaction entre le spin électronique et le spin nucléaire ($S = 5/2$, $I = 5/2$) de l'ion Mn^{2+} . Les transitions hyperfines sont bien résolues et régulièrement espacées de l'ordre de 95 G, ce qui témoigne de la symétrie octaédrique de l'environnement.

A partir de différentes concentrations en manganèse et en mesurant la hauteur de la première raie, on peut alors réaliser une droite de calibration qui permet de relier l'intensité du signal observé à la quantité de manganèse libre en solution.

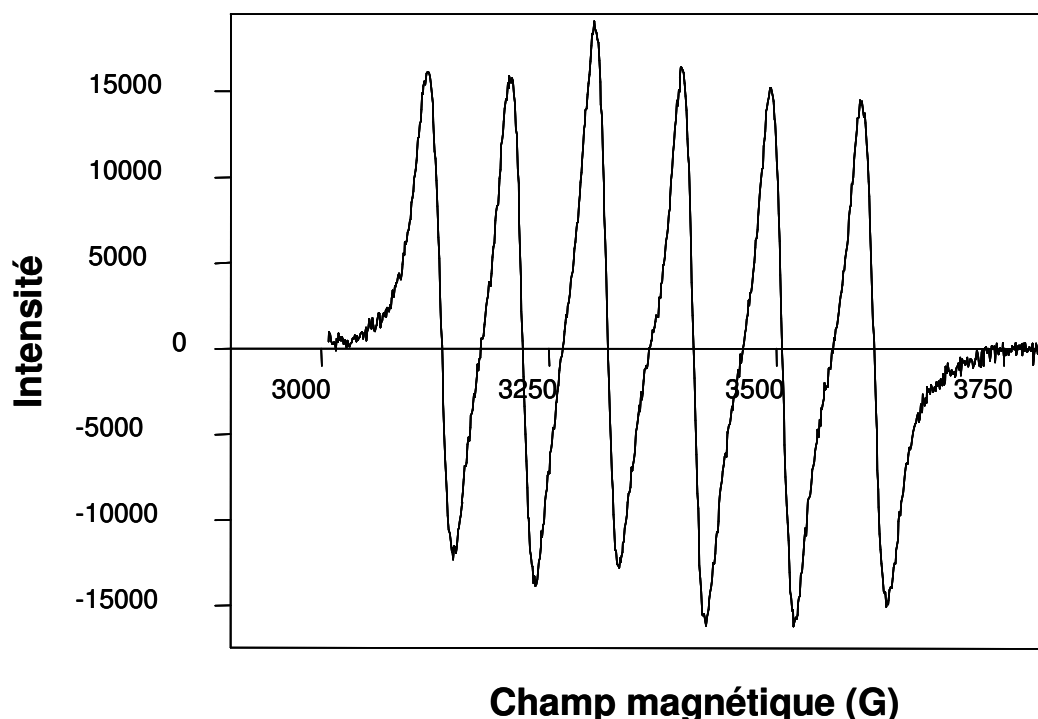


Figure I.10 : spectre RPE à température ambiante d'une solution de 1 équivalent de MnCl_2 .

- Dosage du site de régulation de PerR-Zn :

On ajoute progressivement une solution de MnCl_2 à une solution d'apoprotéine. Selon le pourcentage d'oxydation de l'échantillon, nous observons que le signal du manganèse libre apparaissait à des concentrations différentes. En effet, pour un échantillon dont le spectre de masse permet d'estimer l'oxydation à environ 15%, on observe que le signal des six raies commence à apparaître à environ 0,75 équivalent de MnCl_2 ajouté. En dessous de cette quantité de métal, aucun signal n'apparaît et le spectre est similaire à celui de l'apoprotéine. Pour un échantillon oxydé à environ 80%, le signal des six raies apparaît à partir de 0,2 équivalent de MnCl_2 ajouté. Enfin, pour un échantillon 100% oxydé, dès les premiers ajouts de métal, le signal des six raies est observé, indiquant que le manganèse reste libre en solution et qu'il n'est pas incorporé au sein de la protéine. Il apparaît donc clairement que l'oxydation de la protéine PerR (adduit + 16 Da) empêche la fixation du métal de régulation. La figure I.11(A) présente un exemple de spectres obtenus pour un échantillon de PerR oxydé à environ 15%. En mesurant la hauteur de la 1^{ère} raie de chaque spectre, on peut calculer, grâce à la droite de calibration, la quantité de manganèse libre dans chaque condition. Les résultats

obtenus sont reportés sur le graphe présenté en figure I.11(B). Ce graphe représente la variation de manganèse libre en fonction du manganèse ajouté à la solution de protéine.

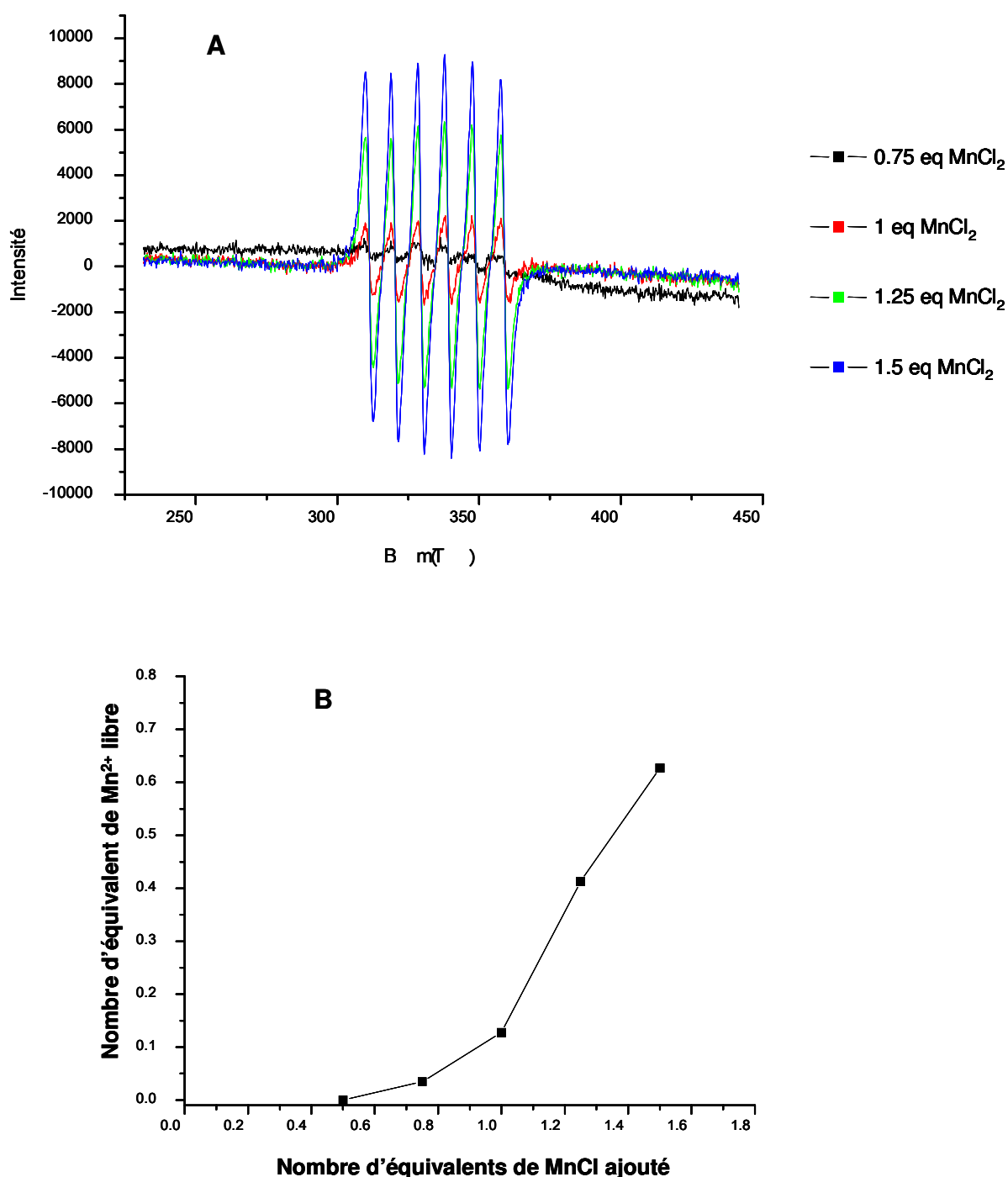


Figure I.11 : (A) spectres RPE à température ambiante de PerR + MnCl_2 . $[\text{PerR}] = 100 \mu\text{M}$ dans le tampon Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 250 mM traité Chelex-100 ; fréquence 9,39 GHz, puissance 10 mW, amplitude de modulation 10 Gauss, et fréquence de modulation 100 KHz.
(B) incorporation du manganèse par une protéine oxydée à 15%.

L'absence de coloration de l'échantillon de protéine après ajout de manganèse suggère que le manganèse n'est pas oxydé en Mn^{3+} (qui est silencieux). Une fois lié à la protéine, le manganèse est très stable alors qu'il peut s'oxyder assez facilement dans le tampon seul. En effet, dans le tampon seul, l'ajout de $MnCl_2$ laisse apparaître une coloration brunâtre après quelques minutes.

D'après les données de la littérature, la protéine PerR lie un équivalent de manganèse (Mn^{2+}) par monomère. Nos expériences ont montré que l'incorporation du manganèse par un lot de protéines était dépendante du pourcentage d'oxydation de ce lot. Ce résultat indique que l'oxydation de la protéine au niveau d'un des ligands du site de régulation empêche la fixation du métal régulateur. Cette oxydation de la protéine se fait très probablement via un mécanisme identique à celui de la détection d' H_2O_2 . L'inactivation de la protéine peut avoir lieu pendant la culture cellulaire ou lors des différentes étapes de purification. Une telle oxydation est donc « critique » pour l'étude biochimique et fonctionnelle de PerR. Il est donc essentiel de mettre au point un protocole de purification qui permette d'obtenir une protéine pure et non oxydée. Il faut noter que le groupe de J.D. Helmann travaille généralement, lors des expériences *in vitro*, avec une protéine à 60% active. Ces auteurs supposent que l'oxydation de la protéine a lieu pendant sa purification et qu'une concentration de 10 mM en EDTA est cruciale afin de limiter l'oxydation des différents échantillons de PerR (Lee & Helmann, 2006a).

Dans la suite de ce travail, nous nous sommes attachés à mettre au point un protocole reproductible d'obtention de PerR conduisant à une forme très majoritairement active. Cette mise au point a été motivée par le souci d'obtenir des données biochimiques précises telles que les constantes d'affinité PerR-ADN, PerR-métal et d'avancer dans la compréhension du mécanisme réactionnel de détection d' H_2O_2 .

IV. Modifications apportées au protocole initial.

De nombreux essais ont été nécessaires avant d'aboutir à un protocole permettant d'obtenir une protéine non oxydée.

L'une des explications possibles de l'oxydation de PerR est que la protéine, sous une forme $PerR-Zn-Fe^{2+}$ dans les conditions de culture cellulaire, réagisse avec le peroxyde d'hydrogène généré dans le milieu. En effet, la forme à fer de PerR est extrêmement sensible à H_2O_2 et le produit de la réaction, selon le groupe de J.D. Helmann, est la formation de 2-

oxo-histidine en position 37 et/ou 91 (Lee & Helmann, 2006a). La présence de fer dans les milieux de culture est donc un paramètre important que nous avons tenté de contrôler. L'un des moyens mis en œuvre a donc été de modifier les conditions de culture cellulaires en réalisant des essais en milieu minimum M9 où l'apport en métal peut être finement contrôlé. Des essais avec des concentrations plus faibles en fer, en absence de fer ou en excès de manganèse (afin de favoriser dans le milieu la forme PerR-Zn-Mn beaucoup moins sensible vis-à-vis d'H₂O₂ que la forme PerR-Zn-Fe) ont été réalisés. Dans toutes ces conditions, la sur-expression de la protéine reste correcte mais la spectrométrie de masse indique qu'elle est en partie oxydée. De plus, les taux d'oxydation de la protéine restent variables d'un lot à l'autre (de l'ordre de 30 à 50 %).

Finalement, nous nous sommes placés dans les conditions de milieu minimum M9 en l'absence de fer. Un chélateur spécifique du fer a été ajouté au milieu M9 : la desferrioxamine. Ce composé, dont la structure est présentée figure I.12, présente une très forte affinité pour les ions ferriques (Fe³⁺) avec une constante de stabilité log K= 30,6 (Goodwin & Whitten, 1965). L'EDTA, qui représente un chélateur de métaux divalents, a été conservé dans les tampons de purification. Dans ces conditions, la présence de fer disponible, que ce soit sous forme Fe³⁺ ou sous forme Fe²⁺, est largement limitée.

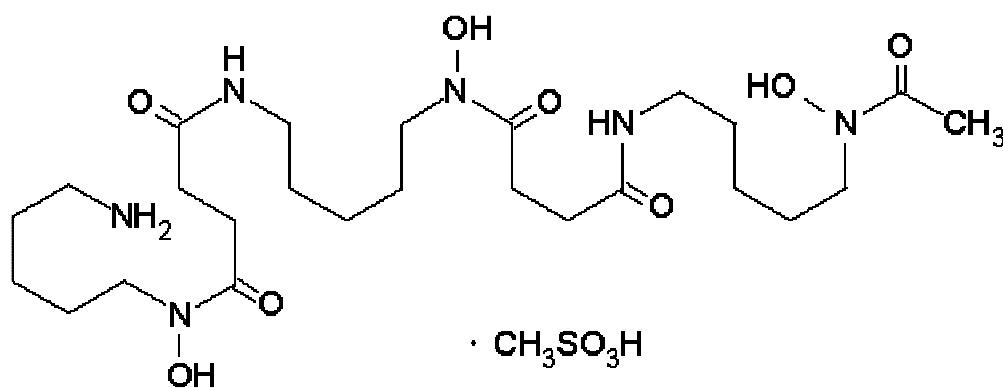


Figure I.12: structure de la desferrioxamine mésylate.

Dans la phase de culture, la desferrioxamine est à une concentration de 5 µM. Le nouveau tampon d'extraction est composé de Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 20 mM, desferrioxamine 1 mM. Dans ces conditions, la sur-expression de la protéine PerR reste comparable aux premières conditions de culture en milieu enrichi (milieu LB). De plus, la spectrométrie de masse indique que la protéine est très majoritairement sous une forme non oxydée (taux d'oxydation inférieur à 10%). Il faut noter que ces résultats sont reproductibles d'un lot à l'autre. La présence de fer dans les tampons ou les milieux de culture semble donc

être à l'origine de l'oxydation de PerR. La figure I.13A présente le spectre de masse de la protéine entière. La figure I.13B présente celui de la digestion trypsique : les fragments I et II sont présents sous une seule forme non oxydée.

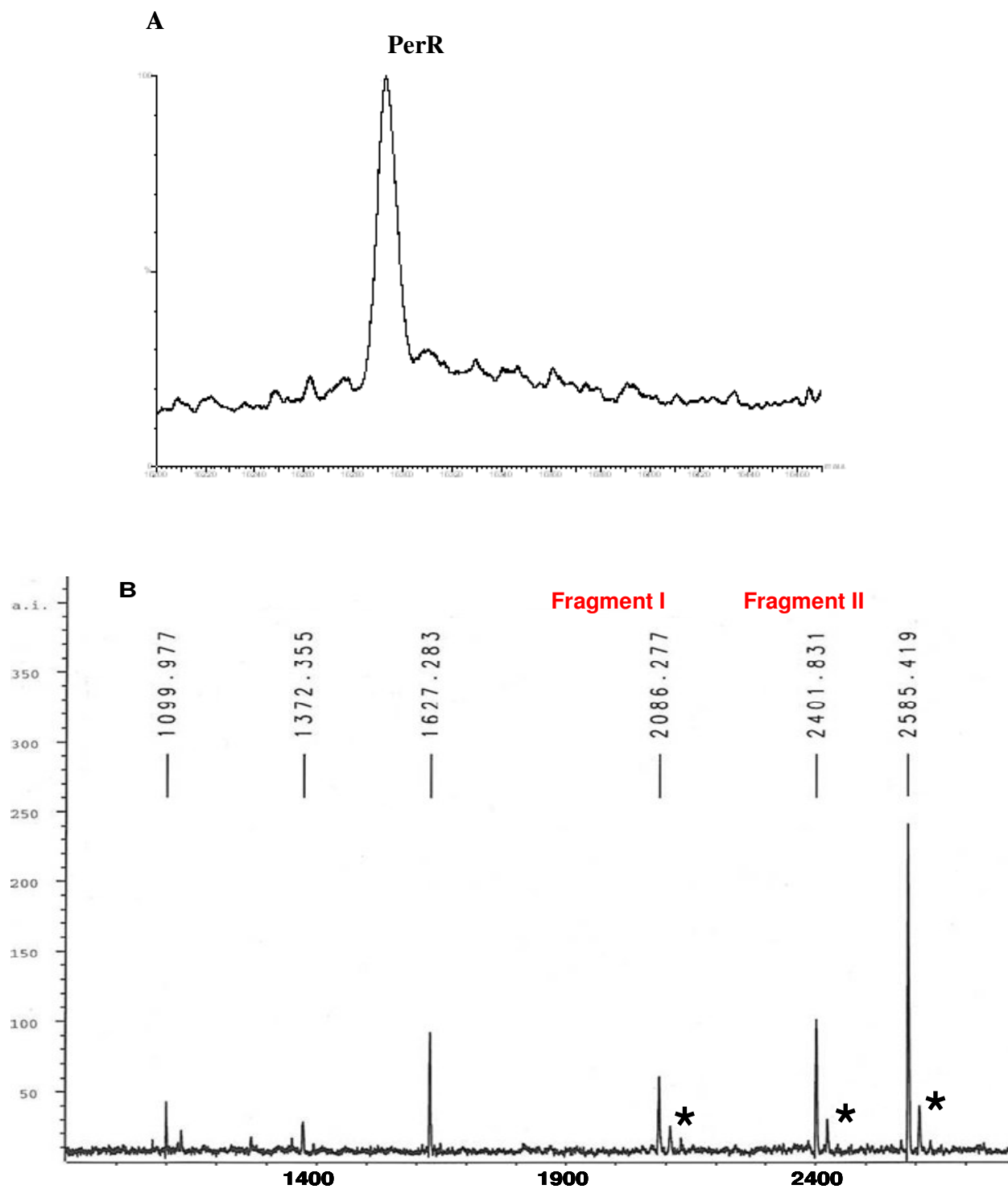


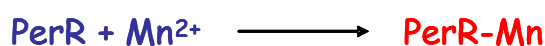
Figure I.13 : spectres de masse de PerR (A, Electrospray) et de sa digestion trypsique (B, Maldi-TOF). Les pics marqués d'un astérisque correspondent à des adduits de Na⁺ sur les fragments principaux (+ 23 Da).

La métallation par le manganèse de différents lots de protéine issus de ce protocole de purification a été analysée par spectroscopie RPE. Les résultats obtenus montrent que, pour l'ensemble des échantillons, en dessous de 0,9 équivalent de métal ajouté, aucun signal n'est observé. Le signal à 6 raies du manganèse libre en solution commence à apparaître au-delà de 0,9 équivalent ajouté. Ce résultat valide le protocole de purification mis au point conduisant à un lot pur, homogène et non oxydé de PerR-Zn. Par ailleurs, il permet de relier directement l'état d'oxydation de la protéine avec l'incorporation du métal de régulation et son activité de liaison à l'ADN. L'obtention d'une protéine non oxydée et donc totalement active était primordiale pour les études biochimiques et fonctionnelles qui constituent mon travail de thèse. Ce premier objectif a pu être atteint grâce aux différentes modifications apportées au protocole initial décrit par le groupe de J.D. Helmann.

V. Affinité de la protéine pour le Mn^{2+} .

1) Principe

Comme nous l'avons énoncé précédemment, les propriétés du Mn^{2+} permettent de suivre son incorporation au sein de la protéine grâce à la spectroscopie RPE. En poussant plus en avant cette analyse de la métallation de PerR-Zn, la spectroscopie RPE devrait également nous permettre de déterminer l'affinité de la protéine pour le Mn^{2+} . Nous savons que PerR-Zn fixe un équivalent de Mn^{2+} par monomère. La complexation du manganèse par la protéine peut donc être exprimée par l'équation suivante :



$$\text{Soit } K_d = \frac{[PerR][Mn]}{[Complexe]} \text{ (où } Mn^{2+} \text{ est noté Mn, et PerR-Mn noté Complexe)}$$

Les lois de conservation de la matière conduisent à:

$$(1) \quad [Mn]_0 = [Mn] + [Complexe] \qquad (2) \quad [PerR]_0 = [PerR] + [Complexe]$$

De l'expression de la constante de dissociation, on tire :

$$[PerR] = \frac{[K_d][Complexe]}{[Mn]}$$

Reporté dans (2), cela donne :

$$[PerR]_0 = [Complexe] \left\{ 1 + \frac{K_d}{[Mn]} \right\} \quad \text{soit} \quad [Complexe] = \frac{[Mn]}{K_d + [Mn]} [PerR]_0$$

Si l'on reporte cette expression de la concentration en complexe dans l'expression de la concentration en manganèse initiale, on obtient alors:

$$[Mn]_0 = [Mn] \left(1 + \frac{[PerR]_0}{[Mn] + K_d} \right) \quad \text{soit} \quad [Mn]_0 = ([Mn] + K_d + [PerR]_0) \frac{[Mn]}{[Mn] + K_d}$$

On obtient donc une équation du second degré en $[Mn]$:

$$[Mn]^2 + \{[PerR]_0 + K_d - [Mn]_0\}[Mn] - K_d[Mn]_0 = 0$$

La solution vaut précisément :

$$[Mn] = \frac{1}{2} \left\{ ([Mn]_0 - [PerR]_0 - K_d) + \sqrt{([PerR]_0 + K_d - [Mn]_0)^2 + 4K_d[Mn]_0} \right\}$$

$$\text{soit} \quad \frac{[Mn]}{[PerR]_0} = \frac{1}{2} \left\{ \left(\frac{[Mn]_0}{[PerR]_0} - 1 - \frac{K_d}{[PerR]_0} \right) + \sqrt{\frac{([PerR]_0 + K_d - [Mn]_0)^2 + 4K_d[Mn]_0}{[PerR]_0^2}} \right\}$$

On pose

$$\delta = \frac{([PerR]_0 + K_d - [Mn]_0)^2 + 4K_d[Mn]_0}{[PerR]_0^2} = \left(\frac{K_d}{[PerR]_0} + 1 - \frac{[Mn]_0}{[PerR]_0} \right)^2 + 4 \frac{K_d}{[PerR]_0} \frac{[Mn]_0}{[PerR]_0} \quad \text{et}$$

$n_{eq} = \frac{[Mn]_0}{[PerR]_0}$ (nombre d'équivalent de Mn^{2+} par rapport à la protéine), on a alors

$$\frac{[Mn]}{[PerR]_0} = \frac{1}{2} \left\{ \left(n_{eq} - 1 - \frac{K_d}{[PerR]_0} \right) + \sqrt{\left(1 + \frac{K_d}{[PerR]_0} - n_{eq} \right)^2 + 4n_{eq} \frac{K_d}{[PerR]_0}} \right\}$$

$$\text{Or, on a aussi} \quad \delta = \left(\frac{K_d}{[PerR]_0} + 1 - n_{eq} \right)^2 + 4n_{eq} \frac{K_d}{[PerR]_0} = \left(1 + \frac{K_d}{[PerR]_0} + n_{eq} \right)^2 - 4n_{eq}$$

Finalement, on obtient l'expression suivante permettant de déterminer le K_d :

$$\frac{[Mn]}{[PerR]_0} = \frac{1}{2} \left\{ \left(n_{eq} - 1 - \frac{K_d}{[PerR]_0} \right) + \sqrt{\left(1 + \frac{K_d}{[PerR]_0} + n_{eq} \right)^2 - 4n_{eq}} \right\}$$

2) Affinité de l'ion Mn^{2+} pour la protéine *PerR*

A une solution d'apoprotéine très peu oxydée de l'ordre de 10% (issue du protocole modifié présenté dans le paragraphe précédent), on ajoute progressivement une solution de $MnCl_2$. Des ajouts correspondants à 0,5, 0,75, 1, 1,25 et 1,5 équivalents de $MnCl_2$ par rapport à la protéine ont été réalisés. Le signal du manganèse libre commence à apparaître légèrement à partir de 0,75 équivalent en manganèse ajouté. En mesurant la hauteur de la 1^{ère} raie de chaque spectre, on peut calculer, grâce à une droite de calibration obtenue à partir de $MnCl_2$ en solution, la quantité de manganèse libre dans chaque condition. Les résultats obtenus sont reportés sur le graphe présenté en figure I.14. Ce graphe représente la variation de manganèse libre en fonction du manganèse ajouté à la solution de protéine.

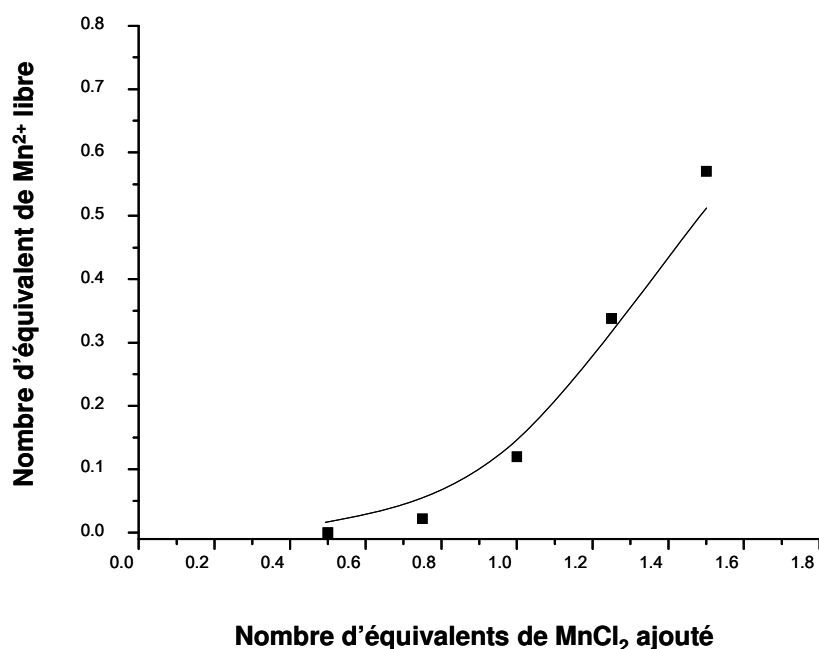


Figure I.14 : variation du nombre d'équivalent de Mn^{2+} libre en fonction du nombre d'équivalents de $MnCl_2$ ajouté à une solution de protéine très peu oxydée.

La concentration initiale de la protéine est égale à 100 μM . En considérant que la protéine n'est pas du tout oxydée, ce dosage permet d'évaluer l'affinité de la protéine pour le Mn^{2+} avec un K_d de 2,1 μM . Cette valeur est très proche de la valeur proposée par Lee et Helmann (Lee & Helmann, 2006b). En effet, en réalisant des expériences de formation du complexe ADN-PerR suivies en anisotropie de fluorescence, ces auteurs déterminent un K_d PerR- Mn^{2+} de 2,8 μM (Lee & Helmann, 2006b). Bien que le taux d'oxydation de PerR de l'ordre de 10% (estimé en spectrométrie de masse) soit relativement faible, ce pourcentage de protéines n'incorpore pas de métal et il doit donc être pris en compte lors du « fit » des points expérimentaux.

La complexation du manganèse par PerR est donc, en réalité, exprimée par l'équation suivante :



où PerR_{ox} représente la protéine oxydée qui ne lie pas le manganèse.

De manière analogue à la démonstration précédente, on obtient l'équation suivante où le pourcentage p de protéine réduite, capable de lier le métal, a été introduit ($[\text{PerR}]_0$ est remplacé par $p[\text{PerR}]_0$).

$$\frac{[\text{Mn}]}{[\text{PerR}]_0} = \frac{1}{2} \left\{ \left(n_{eq} - p - \frac{K_d}{[\text{PerR}]_0} \right) + \sqrt{\left(p + \frac{K_d}{[\text{PerR}]_0} + n_{eq} \right)^2 - 4pn_{eq}} \right\}$$

La courbe présentée figure I.15 est alors obtenue. L'ajustement des points expérimentaux permet alors de déterminer un pourcentage d'oxydation de la protéine de l'ordre de 6,5%. Dans ce cas, le K_d obtenu est égal à 0,7 μM . Bien que trois fois inférieur à la valeur calculée précédemment, ce K_d reste dans le même ordre de grandeur. Le pourcentage de protéine oxydée, c'est-à-dire incapable de fixer le métal a été pris en compte lors de ces calculs et a pu être déterminé avec précision grâce à la RPE. Nous pouvons donc penser que cette dernière valeur du $K_d = 0,7 \mu\text{M}$ reflète véritablement l'affinité de la protéine pour Mn^{2+} .

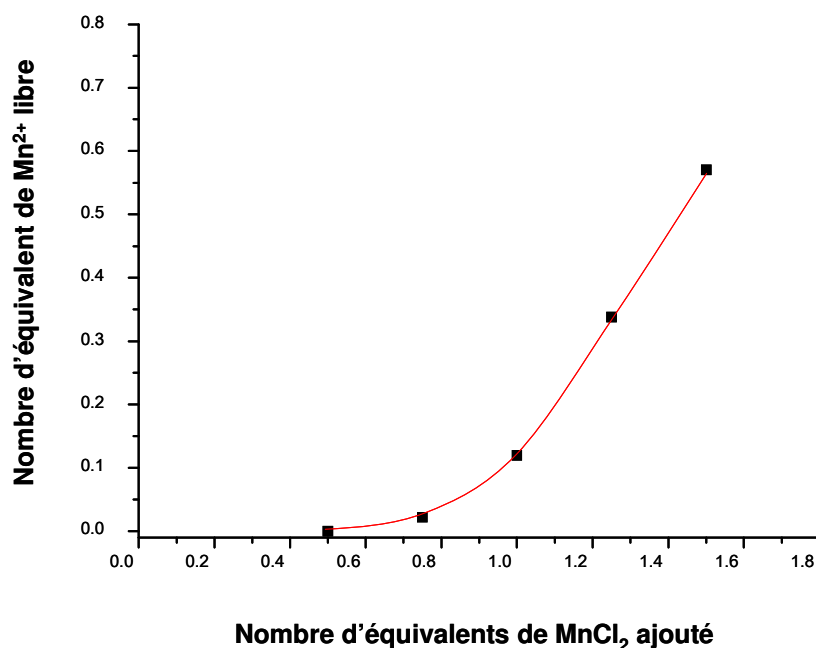


Figure I.15 : variation du nombre d'équivalent de Mn^{2+} libre en fonction du nombre d'équivalents de $MnCl_2$ ajouté à une solution de protéine très peu oxydée. Le « fit » tient compte du pourcentage d'oxydation de la protéine.

VI. Affinité de la protéine pour l'ADN.

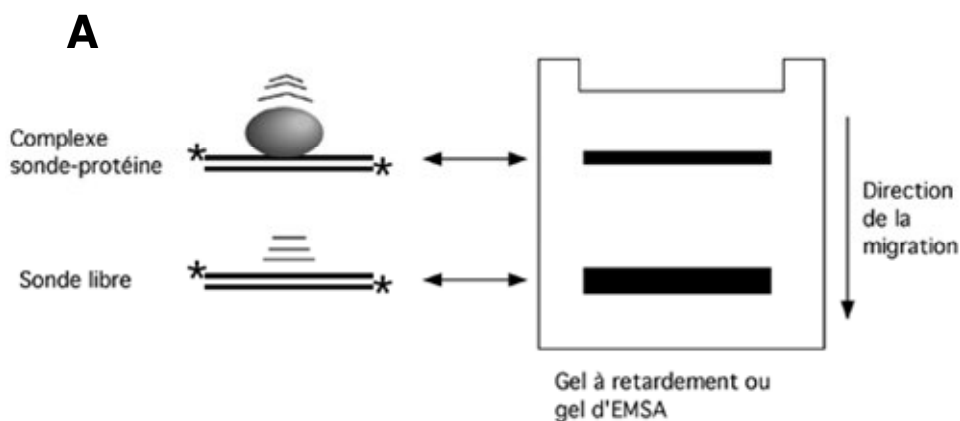
Une autre façon de valider le protocole de purification de PerR a été de vérifier l'activité de la protéine par des expériences d'interaction avec l'ADN en présence de métal. En effet, PerR est un répresseur de la transcription. En conditions normales, la protéine est liée à sa séquence de reconnaissance sur l'ADN. Une des façons de vérifier l'intégrité de la protéine obtenue après purification est de mettre en évidence la formation du complexe ADN/Protéine. Cette vérification a été réalisée par des expériences de retard sur gel (ou EMSA pour **E**lectro**M**obility **S**hift **A**ssay).

1) Principe

Cette technique permet d'étudier une interaction entre un brin d'ADN et une protéine. Elle repose sur le fait qu'un complexe ADN-protéine migrera moins vite dans un gel non-

dénaturant qu'un ADN libre. Ce retard de migration permet de juger au premier coup d'œil si la séquence d'ADN a été reconnue par la protéine (Figure I.16A). La séquence d'ADN utilisée contient la boîte PerR du gène *mrgA* (Figure I.16B).

Les expériences de retard sur gel ont été effectuées après marquage radioactif de l'oligonucléotide ([ADN] = 0,2 nM). Ce marquage permet, après autoradiographie (ici numérique au Phosphorimager), de visualiser la migration de l'ADN.



B 5' GCTGATCTAAATTTATAATTATTATAATTTAGTATTG 3'

Figure I.16 : (A) schéma expliquant le principe du gel retard. (B) oligonucléotide utilisé pour vérifier l'interaction de PerR avec l'ADN.

2) Interaction ADN/PerR

La figure I.17 présente la formation du complexe ADN-PerR en fonction de la concentration en protéine (lignes 2-7) en présence de Mn^{2+} . Une bande retardée sur gel commence à apparaître pour une concentration en protéine de 5 nM (ligne 3). Cette bande correspond à la formation du complexe ADN-PerR. L'ADN est totalement complexé au dessus d'une concentration de 20 nM en protéine (lignes 5-6). Cette simple expérience a permis de mettre en évidence que la protéine, issue du protocole de purification, est active après métallation. En effet, en absence de métal ou en présence d'EDTA (1 mM), il n'y a pas formation du complexe ADN/PerR. La fixation de la protéine PerR sur l'ADN est donc dépendante de la présence du Mn^{2+} . Ce résultat suggère que la coordination du métal dans le site de régulation modifie la conformation de la protéine et qu'elle adopte alors une forme capable de lier l'ADN. Un tel processus est également rencontré dans d'autres types de

régulateurs bactériens. C'est par exemple le cas de la protéine Fur d'*E. coli* dont la fixation à l'ADN est liée à la présence de Fe^{2+} dans le site de régulation. Les changements conformationnels de la protéine PerR ont été étudiés plus en détail et les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre III de la partie résultats.

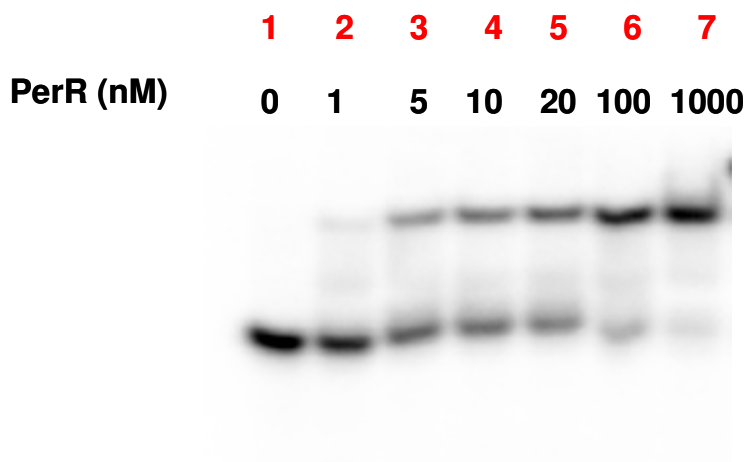


Figure I.17 : visualisation de l'interaction de PerR par gel retard. Gel de polyacrylamide Tris acétate 15%, pH 8,5; [ADN] = 0,2 nM; incubation 20min à 20°C. Tampon: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 5% glycérol; 0,05% triton, 100 μM MnCl_2 .

3) Affinité de la protéine pour l'ADN

A partir de l'expérience précédente, le pourcentage de complexe ADN-PerR formé est déterminé et porté sur un graphe en fonction de la concentration de PerR. La valeur de la constante de dissociation est alors calculée en utilisant l'équation suivante:

$$y = 250 \left((0.2 + x + K_d) - \sqrt{(0.2 + x + K_d)^2 - 0.8x} \right)$$

x est la concentration en protéine. [ADN] = 0.2 nM.

Le modèle qui a permis l'obtention de cette équation est expliqué dans le chapitre 4 qui traite en détail des interactions ADN/protéine. La figure I.18 présente le graphe obtenu à partir de cette équation pour trois expériences indépendantes. Il permet de déterminer la constante de dissociation du complexe PerR-ADN.

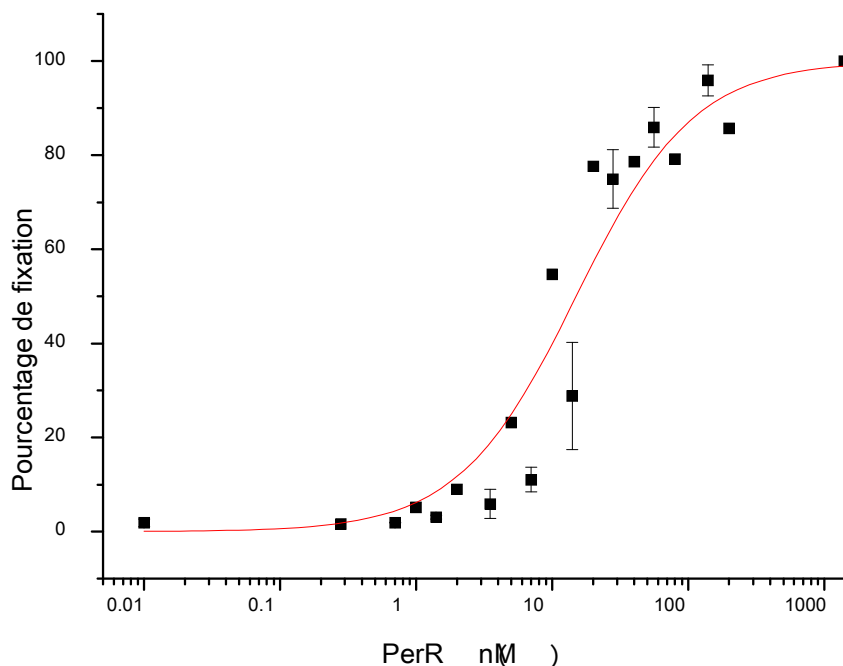


Figure 1.18 : tracé permettant la détermination du K_d PerR-ADN.

Les expériences de retard sur gel effectuées avec la protéine PerR et la séquence d'ADN non modifiée conduisent à une valeur de K_d de l'ordre de 15 nM. Cette valeur reflète la grande stabilité du complexe ADN-PerR. Les données de la littérature indiquent une valeur de K_d de l'ordre de 1,5 nM (Lee & Helmann, 2006b). Dans notre cas, les expériences de gel retard ont été réalisées avec une séquence d'ADN plus courte ce qui peut expliquer cette différence.

VII. Conclusion.

En résumé, la protéine PerR de *B. subtilis* a été purifiée sous forme de dimère apo-PerR-Zn. L'analyse en spectroscopie d'absorption atomique des échantillons obtenus après purification indique la présence d'un atome de zinc par monomère. Ce résultat suggère que le site à zinc joue un rôle structural et que la protéine présente une forte affinité pour ce métal. L'étude plus approfondie du site à zinc est décrite dans le chapitre suivant.

Le premier protocole utilisé pour l'obtention de PerR aboutit à la présence de deux formes de la protéine : la forme native et une forme oxydée présentant un adduit de 16 Da.

L'incorporation du manganèse par la protéine PerR-Zn a été suivie en RPE. Les résultats obtenus ont montré que la capacité d'incorporation du métal est directement reliée au pourcentage d'oxydation de la protéine. La nature du produit d'oxydation est traitée dans le chapitre V.

Un protocole permettant d'obtenir une protéine très majoritairement réduite a été mis au point. L'apport en fer a été contrôlé en se plaçant en milieu minimum pour la culture et en ajoutant des chélateurs du Fe^{2+} (EDTA pendant la purification) et du Fe^{3+} (desferrioxamine pendant la phase de culture). En effet, l'une des hypothèses permettant d'expliquer l'oxydation de la protéine serait qu'au sein de la cellule la forme PerR-Zn-Fe réagirait avec le peroxyde d'hydrogène présent dans le milieu selon son propre mécanisme d'activation. En éliminant toute trace de fer disponible pour la protéine, on l'empêche ainsi de réagir avec H_2O_2 et donc de « s'auto-oxyder ».

L'affinité de la protéine PerR pour le Mn^{2+} a pu être évaluée grâce à la spectroscopie RPE. Cette technique nous a permis de déterminer la valeur de la constante de dissociation PerR- Mn^{2+} en tenant compte du pourcentage d'oxydation de l'échantillon. Cette technique conduit à une valeur du K_d d'environ $0,7 \mu\text{M}$.

Enfin, l'activité de la protéine, c'est-à-dire sa capacité à fixer sa séquence de reconnaissance sur l'ADN, a été évaluée par la technique du retard sur gel. Les expériences ont montré que la fixation de PerR à l'ADN est dépendante du métal de régulation (ici le Mn^{2+}) et ont permis de déterminer un K_d de la protéine pour l'ADN égal à 15 nM . Notre protocole de purification permet donc d'obtenir une protéine active capable d'interagir avec l'ADN de manière spécifique. Le mode d'interaction ADN/PerR sera abordé plus en détails dans le chapitre IV.

Abragam, A. & Bleaney, B. (1970). Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions *Oxford University Press*.

Atta, M., Nordlund, P., Aberg, A., Eklund, H. & Fontecave, M. (1992). Substitution of Manganese for Iron in Ribonucleotide Reductase from *Escherichia-Coli* - Spectroscopic and Crystallographic Characterization. *J Biol Chem* **267**: 20682-20688.

Goodwin, J. F. & Whitten, C. F. (1965). Chelation of Ferrous Sulphate Solutions by Desferrioxamine B. *Nature* **205**: 281-283.

Hamed, M. Y. & Neilands, J. B. (1994). An Electron-Spin-Resonance Study of the Mn(II) and Cu(II) Complexes of the Fur Repressor Protein. *J Inorg Biochem* **53**: 235-248.

Herbig, A. F. & Helmann, J. D. (2001). Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *MolMicrobiol* **41**: 849-859.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006a). The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* **440**: 363-367.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006b). Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J Biol Chem* **281**: 23567-23578.

Reed, G. H. & Cohn, M. (1970). Electron Paramagnetic Resonance Spectra of Manganese(II)-Protein Complexes . Manganese(II)-Concanavalin-A. *J Biol Chem* **245**: 662-664.

Stadtman, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* **9**: 315-325.

Whiting, A. K., Boldt, Y. R., Hendrich, M. P., Wackett, L. P. & Que, L. (1996). Manganese(II)-dependent extradiol-cleaving catechol dioxygenase from *Archrobacter globiformis* CM-2. *Biochemistry* **35**: 160-170.

Chapitre II

**Structure cristallographique de
PerR-Zn et étude du site à zinc.**

I. Structure cristallographique de la forme apo PerR-Zn.

Le protocole de purification décrit dans le chapitre précédent conduit à l'obtention d'un lot de protéine pure et homogène. Des essais de cristallisation réalisés en collaboration avec le groupe Synchrotron du LCCP (**L**aboratoire de **C**ristallographie et **C**ristallogénèse des **P**rotéines) de l'IBS (**I**nstitut de **B**iologie **S**tructurale-Grenoble) ont permis de cristalliser la forme apo (PerR-Zn) de la protéine. A partir de ces cristaux, la structure cristallographique de la forme PerR-Zn a été résolue à 1,7 Å par la méthode MAD (*Multiple Anomalous Diffraction*). Cette structure cristallographique est à ce jour la seule d'une métalloprotéine de la famille des protéines « Fur-like », senseur de H₂O₂.

L'ensemble de la protéine est structuré en homodimère. Chaque monomère peut être séparé en deux domaines : le domaine N-terminal (Figure II.1 : H1-H4, B1-B2), composé des acides aminés Ala-2 à Asp-85 (la première méthionine est clivée par la bactérie) et le domaine C-terminal formé par les acides aminés Tyr-92 à His-145 (Figure II.1 : B3-B5, H5-H6). Les deux domaines sont reliés par une boucle constituée des acides aminés Phe-86 à His-91.

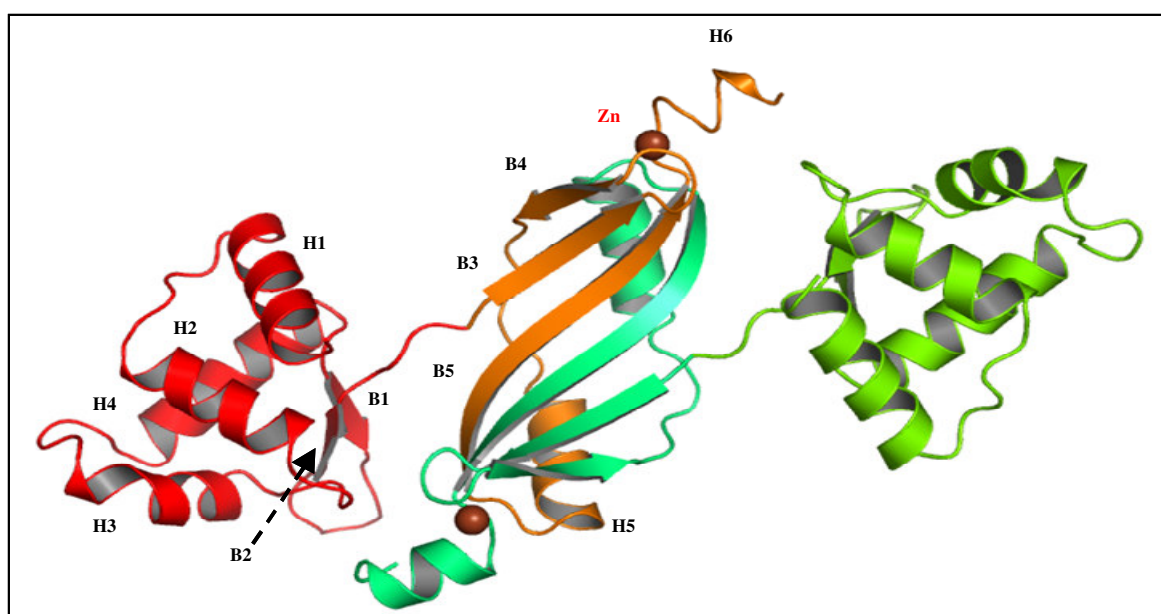


Figure II.1 : structure cristallographique de la protéine PerR-Zn .Vue du dimère cristallin avec annotation des structures secondaires.

La dimérisation se fait grâce à un domaine $\alpha\beta$ (Figure II.2) composé de deux hélices α (H5 et H5') et six brins β (B3, B4, B5 et B3', B4', B5'). Dans cet environnement, le dimère est stabilisé par les brins β qui forment un feuillet antiparallèle à six brins. L'ensemble de la

structure est maintenue grâce à des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes entre les deux monomères.

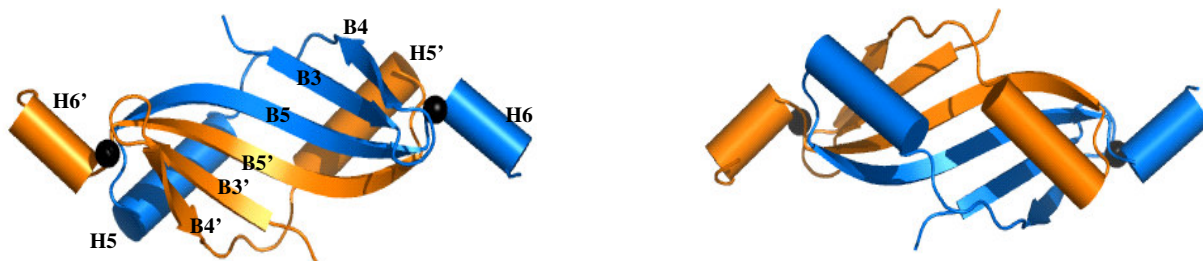


Figure II.2. : domaine de dimérisation de la protéine PerR.

Le domaine de fixation à l'ADN est composé de quatre hélices α (H1, H2, H3, H4) suivies de deux brins β (B1, B2) formant un feuillet antiparallèle. La zone d'interaction potentielle avec l'ADN se situe sur l'hélice H4 (présente au sein du motif H3-T-H4): elle va de la sérine 55 à la sérine 69. Cette hélice a été identifiée grâce à des superpositions de structure de PerR avec d'autres protéines interagissant avec l'ADN telles que Fur de *Pseudomonas aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003), DtxR de *Corynebacterium diphtheriae* (Pohl *et al.*, 1998) et IdeR de *Mycobacterium tuberculosis* (Pohl *et al.*, 1999). La superposition de ces structures au niveau du domaine N-terminal est représentée sur la figure II.3.

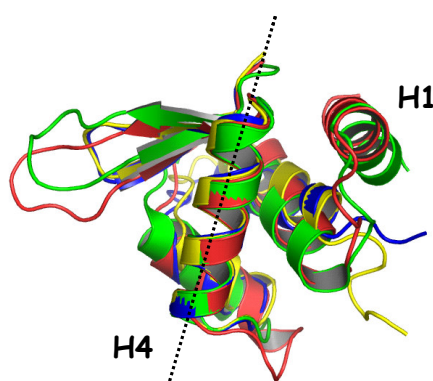


Figure II.3. : superposition des structures des protéines Fur *P. aeruginosa* (vert), DtxR *C. diphtheriae* (bleu), IdeR *M. tuberculosis* (jaune) et PerR *B. subtilis* (rouge).

La structure cristallographique de la protéine apo PerR-Zn a permis de révéler un site à zinc original pour cette métalloprotéine senseur d' H_2O_2 . En effet, le Zn^{2+} est coordonné par les quatre cystéines (96, 99, 136 et 139) d'une sous unité. Elles forment ainsi un tétraèdre

(Figure II.4A). Les deux paires de cystéines 96-99 et 136-139 sont situées, respectivement, entre les deux brins B3 et B4, et le brin B5 et l'hélice terminale H6 (Figure II.1). Les distances Zn-S, comprises entre 2,32 et 2,36 Å, sont en accord avec les distances moyennes observées pour les complexes thiolates du zinc. Cette coordination tétraédrique Zn(Cys)₄ diffère de celle qui est supposée pour la plupart des protéines « Fur-like », à savoir deux cystéines et deux histidines.

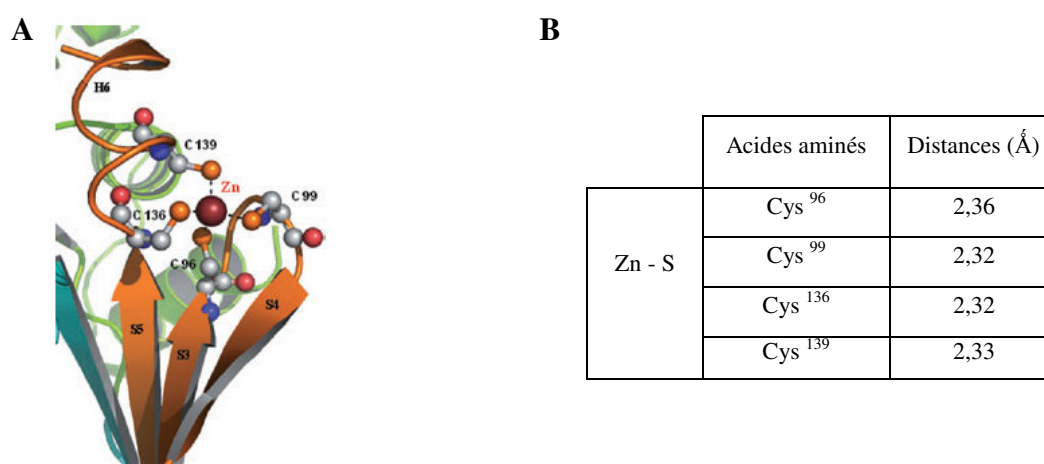


Figure II.4 : (A), zoom sur le site à zinc. (B), distances dans la première sphère de coordination du Zn²⁺.

En ce qui concerne la protéine Fur d'*E. coli*, une étude par spectroscopie d'absorption X a montré que le zinc est tétracoordonné (Jacquamet *et al.*, 1998). Deux ligands sont des soufres provenant de deux cystéines, les deux autres ligands étant des azotes ou des oxygènes. Au moins un atome donneur serait un azote provenant d'une histidine. Des expériences d'alkylation des cystéines ont permis d'identifier les cystéines 92 et 95 comme ligands du zinc (de Peredo *et al.*, 1999). Dans le cas de la protéine Fur de *P. aeruginosa*, aucun résidu cystéine n'est impliqué dans le site de liaison du zinc structural. Ce site a été identifié grâce à la résolution de la structure cristallographique de la protéine à 1.8 Å et des expériences d'absorption X (Pohl *et al.*, 2003). Ces auteurs indiquent que le zinc est coordonné par deux histidines (32 et 89) et deux acides glutamiques (80 et 100). Contrairement aux protéines de la famille Fur qui contiennent généralement quatre cystéines, la protéine Fur de *P. aeruginosa* ne possède qu'une seule cystéine en position 92 ce qui explique très probablement cette coordination particulière du zinc. Cependant, il faut noter qu'il existe une controverse sur

l'attribution des sites métalliques de cette protéine. Cette controverse est discutée dans le chapitre III des résultats.

II. Résumé de l'article paru dans *Molecular Microbiology*.

L'étude structurale de la protéine apo-PerR-Zn et la caractérisation du site à zinc ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Molecular Microbiology* intitulée **Crystal Structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis***.

L'étude cristallographique d'une protéine est souvent le résultat d'un long travail de biochimie. En effet, l'obtention de cristaux de protéine nécessite, dans un premier temps, de produire une quantité importante d'un lot de protéine pure et homogène. Par ailleurs, la pureté et l'homogénéité d'un échantillon sont également importantes pour les études de réactivité. Dans ce sens, un protocole de purification de PerR a donc été mis au point au laboratoire. Ce protocole aboutit à l'obtention d'une forme apo-PerR-Zn comme le confirme l'analyse des métaux en absorption atomique (0.8 (+/-0.15) mole de Zn^{2+} par mole de monomère de PerR). L'expression et la purification de la protéine sont décrites en détail dans le premier chapitre des résultats. La présence d'un atome de zinc en fin de purification suggère que la protéine présente un site de forte affinité pour ce métal. La forme active de PerR (qui se fixe à l'ADN) peut être reconstituée en fin de purification après addition de Mn^{2+} .

La structure cristallographique de la protéine PerR-Zn a permis de mettre en évidence que les quatre cystéines de chaque monomère sont impliquées dans la coordination d'un atome de zinc, conduisant ainsi à un site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$. D'après les distances de liaison au zinc, ces quatre cystéines sont très probablement sous la forme thiolate. Ce site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ est localisé au niveau du domaine C-terminal ; il est composé par les cystéines 96, 99, 136 et 139 présentes sous forme de double motif CX_2C . La structure de la protéine montre que ce site à zinc verrouille les trois brins β en maintenant les interactions entre les domaines de dimérisation de chaque monomère, favorisant ainsi la stabilité du dimère.

Le rôle structural du site à zinc a été confirmé par des études de réactivité. Le dosage des fonctions thiols libres d'une protéine peut être réalisé grâce au DTNB (acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (Riddles *et al.*, 1983). Celui-ci réagit très rapidement avec une fonction thiolate et conduit au composé TNB^{2-} possédant un coefficient d'extinction molaire

très élevé à 412 nm (Figure II.5, $\epsilon_{412} = 13500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Cette propriété rend cette méthode de dosage très sensible et parfaitement adaptée pour déterminer le pourcentage de thiols libres au sein de la protéine PerR.



Figure II.5 : schéma de la réaction du DTNB avec une fonction thiol libre.

Ces expériences de titrage au DTNB ont montré que l'oxydation des résidus cystéines (par le peroxyde d'hydrogène ou par un oxydant spécifique des fonctions thiols, le diamide) conduit à la formation de deux ponts disulfure intramoléculaires. Cette oxydation entraîne le relargage du zinc (confirmé en absorption atomique). L'oxydation des cystéines et donc la perte du zinc conduisent alors à la dissociation du dimère qui passe sous la forme monomère. Cette dissociation est très probablement due à une perte d'interaction entre les domaines de dimérisation de chaque monomère suite à la perte du zinc. La formation du monomère a été suivie par chromatographie analytique et confirmée en spectrométrie de masse électrospray. En présence de concentrations élevées en espèces oxydantes (de l'ordre de 100 équivalents par rapport à la protéine), la cinétique d'oxydation des cystéines est relativement lente pour ce type de senseur. En effet, la constante de vitesse est égale, dans le cas de PerR, à 4.10^{-3} s^{-1} . A titre indicatif, celle d'OxyR, le senseur d' H_2O_2 chez *E. coli*, est égale à $9,7 \text{ s}^{-1}$ (Lee *et al.*, 2004).

L'ensemble des données cristallographiques et biochimiques confirme donc la présence d'un site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ dont le rôle est essentiellement structural au sein de la protéine PerR de *B. subtilis*.

Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*

Daouda A. K. Traoré,^{1,2†} Abdelnasser El Ghazouani,^{1†} Sougandi Ilango,¹ Jérôme Dupuy,² Lilian Jacquamet,² Jean-Luc Ferrer,² Christelle Caux-Thang,¹ Victor Duarte^{1*} and Jean-Marc Latour^{1*}

¹DRDC/Laboratoire de Physicochimie des Métaux en Biologie, UMR 5155 CEA-CNRS-UJF, CEA-Grenoble, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

²Laboratoire de Cristallographie et de Cristallogenese des Proteines/Groupe Synchrotron, Institut de Biologie Structurale J. P. Ebel, UMR 5075 CEA-CNRS-UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France.

Summary

Bacteria adapt to elevated levels of Reactive Oxygen Species (ROS) by increasing the expression of defence and repair proteins, which is regulated by ROS responsive transcription factors. In *Bacillus subtilis* the zinc protein PerR, a peroxide sensor that binds DNA in the presence of a regulatory metal Mn²⁺ or Fe²⁺, mediates the adaptive response to H₂O₂. This study presents the first crystal structure of apo-PerR-Zn which shows that all four cysteine residues of the protein are involved in zinc co-ordination. The Zn(Cys)₄ site locks the dimerization domain and stabilizes the dimer. Sequence alignment of PerR-like proteins supports that this structural site may constitute a distinctive feature of this class of peroxide stress regulators.

Introduction

Oxidative stress is generated by exposure to elevated levels of Reactive Oxygen Species (ROS), such as superoxide anion, hydrogen peroxide and the highly toxic hydroxyl radical which can damage proteins, nucleic acids and cell membranes (Storz and Imlay, 1999). To avoid or counter the harmful effects of ROS, cells constitutively express proteins to protect themselves and repair the damages. These proteins are under negative control of specific regulators which are the central pieces of the adaptive and inducible

responses to oxidative stress present in cells (Mongkolsuk and Helmann, 2002). These regulators sense the increase of ROS and transduce the signal into increased expression of defence activities. Among the best-understood regulators of oxidative stress responses in bacteria is OxyR which is the hydrogen peroxide sensor in *Escherichia coli*. The OxyR regulon includes genes involved in peroxide metabolism and protection (*katG*, *ahpCF*, *dps*), redox balance (*gorA*, *grxA*, *trxC*) and important regulators such as *fur* and *oxyS* RNA (Zheng *et al.*, 2001a,b). From thorough crystallographic and biochemical analyses, Storz and coworkers (Zheng *et al.*, 1998) have proposed a mechanism based on a H₂O₂-induced thiol–disulphide switch (Choi *et al.*, 2001). However, The Stamler group has given a different picture for the activation of OxyR. Kim *et al.* (2002) find no evidence for an intramolecular disulphide bond but instead demonstrate that Cys-199 of OxyR can undergo different stable chemical modifications in response to oxidative or nitrosative stress. These authors have shown that these modifications affect OxyR DNA binding *in vitro* and suggested that distinct chemical modifications will lead to fine tuning of OxyR activity.

Bacillus subtilis displays an adaptive response to hydrogen peroxide. In this Gram-positive bacteria, the metalloprotein PerR was identified in Helmann's laboratory as a member of the Fur (Ferric uptake regulator) family (Mongkolsuk and Helmann, 2002). PerR is the major regulator of the peroxide stress response, a property that makes it functionally analogous to OxyR. Insight into the mechanism controlling the peroxide stress response in *B. subtilis* emerged from analysis of *mrgA* regulation. This gene encodes a protective DNA binding protein which is a Dps homologue (Chen and Helmann, 1995; Chen *et al.*, 1995). It was initially demonstrated that expression of *mrgA* is subjected to metal regulation. The *mrgA* gene repression, elicited by growth with either added manganese or iron (Chen *et al.*, 1993), is mediated by PerR (Bsat *et al.*, 1998). The *B. subtilis* PerR regulon includes genes coding for MrgA, the major vegetative catalase (KatA), an alkyl hydroperoxide reductase (AhpCF), haem biosynthesis enzymes (HemAXCDBL), a Zn²⁺ uptake P-type ATPase (ZosA), PerR and Fur (Fuangthong *et al.*, 2002). Like other Fur-like homologues, PerR is a small dimeric protein which contains two metal ions per monomer (Herbig and

Accepted 29 June, 2006. *For correspondence. E-mail jean-marc.latour@cea.fr or victor.duarte@cea.fr; Tel. (+33) 438 784 407; Fax (+33) 438 783 462. †These authors contributed equally to this work.

© 2006 The Authors
Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd

Helmann, 2001). One of the metal binding sites co-ordinates a zinc ion that is generally assigned a structural role, whereas the second site binds a regulatory metal required for DNA binding. *In vivo*, there is evidence that PerR can exist in two metallated forms, PerR-Zn-Fe and PerR-Zn-Mn, where either Fe²⁺ or Mn²⁺ functions as corepressor of gene expression. It was shown that H₂O₂ induces PerR dissociation from DNA. However, these two forms of PerR differ dramatically in their response to hydrogen peroxide. In Mn²⁺-added medium the PerR regulon is strongly repressed and peroxide induction is inefficient. In contrast, with Fe²⁺-supplemented medium, peroxide induction is maximal and comparable with that of *perR* null mutant strains (Herbig and Helmann, 2001; Fuangthong *et al.*, 2002). PerR and PerR-like regulators have been identified in a wide variety of organisms including *Campylobacter jejuni* (van Vliet *et al.*, 1999), *Streptomyces reticuli* (Ortiz de Orué Lucana and Schrempf, 2000), *Streptomyces coelicolor* (Hahn *et al.*, 2000), *Streptococcus pyogenes* (King *et al.*, 2000), *Staphylococcus aureus* (Horsburgh *et al.*, 2001) and *Borrelia burgdorferi* (Boylan *et al.*, 2003).

Concerning the activation of PerR by H₂O₂, several hypotheses were first advanced (Herbig and Helmann, 2001; Mongkolsuk and Helmann, 2002). However, very recently, Lee and Helmann (2006) reported that PerR senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. PerR oxidation, mediated by a bound ferrous ion, leads to the incorporation of one oxygen atom into His-37 or His-91, two of the residues that are supposed to co-ordinate the bound Fe²⁺. This oxidation would lead to iron release and dissociation of the PerR DNA adduct. The proposed mechanism relies on the reduction of H₂O₂ by Fe²⁺ and the generation of highly reactive hydroxyl radicals (Fenton reaction). By analogy to metal-catalysed oxidative reactions with histidine-containing enzymes and model peptides (Schoneich, 2000; Uchida and Kawakishi, 1993; 1994), the authors propose that the hydroxyl radical reacts with histidine and generates the 2-oxo-histidinyl radical intermediate which finally leads to the 2-oxo-histidine.

In this report we present the crystal structure of *B. subtilis* apo-PerR-Zn (PerR-Zn). To our knowledge this is the first structure of a metalloprotein involved in the inducible peroxide stress response. Interestingly, the zinc ion of PerR-Zn is co-ordinated by the four cysteine residues of the protein. The Zn(Cys)₄ site plays a crucial role in the stability of the protein by locking the dimerization domain. Molecular modelling of the present PerR-Zn structure allows us to propose a model for the active form of PerR. Moreover, taking advantage of the latter model and the sequence alignment of more than twenty PerR-like proteins we have been able to identify a potential binding site for the regulatory metal.

Results

Purification, metal content analysis and DNA binding

PerR was overexpressed in *E. coli* and purified to homogeneity using a two-step protocol adapted from Herbig and Helmann (2001) (see *Experimental procedures* and Fig. S1 for details). Electrospray ionisation mass spectrometry, under denaturing conditions, indicated an m/z of 16 291.5 (±2.0) Da that corresponds to the expected mass with the missing first methionine residue (calculated m/z for the monomer = 16 292.5 Da). Metal content analysis was carried out by atomic absorption spectroscopy using purified PerR samples that were exchanged into Chelex-100-treated Tris-HCl buffer. The results indicate that zinc is present at a ratio of 0.8 (±0.15) mol of zinc per mol of PerR monomer. Through all preparations of PerR samples, iron and manganese were only detected in trace amounts. Our purification protocol leads exclusively to one form of PerR which retains a single zinc ion per monomer (PerR-Zn). When using Chelex-treated buffers for electrophoretic mobility shift assays, PerR-Zn was inactive and did not bind a DNA fragment containing the PerR box from the *mrgA* promoter. However, upon addition of 1.5 eq. of Mn²⁺ to PerR-Zn, we have been able to reconstitute an active PerR-Zn-Mn protein which binds the *mrgA* PerR box (Fig. S2).

Overall structure of PerR-Zn

The crystal structure of PerR-Zn protein was determined by multiwavelength anomalous diffraction (MAD) and refined to 1.75 Å at the zinc K edge (Table 1). The protein is a homodimer of 144-amino-acid residues (the initial methionine residue is missing). The asymmetric unit of the crystal contains two monomers related by a non-crystallographic twofold axis. Each monomer is composed of two domains, an N-terminal domain (residues 2–85, shown in red for monomer A in Fig. 1) containing the DNA binding motif and a C-terminal domain (residues 92–144, in orange for monomer A in Fig. 1) involved in the dimerization of the protein. The two domains are connected by a loop (residues 86–91). The N-terminal domain is composed of four α-helices (H1–H4) followed by a two-stranded anti-parallel β-sheet (S1, S2). The DNA binding domain of *Bs*-PerR-Zn was identified by structure superposition with other regulators including *Pseudomonas aeruginosa*-Fur (*Pa*-Fur) (Pohl *et al.*, 2003), *Corynebacterium diphtheriae*-DtxR (*Cd*-DtxR) (Pohl *et al.*, 1998), and *Mycobacterium tuberculosis*-IdeR (*Mt*-IdeR) (Pohl *et al.*, 1999a). As illustrated in Fig. S3, all four proteins share the same basic fold with the typical helix–turn–helix (H3–T–H4) motif which contains the putative DNA binding helix H4 (Val-56 to Ser-69 for *Bs*-PerR-Zn). As reported by Huffman and Brennan (2002), a third helix (H2) may sta-

Data collection			
Space group	P1		
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	40.8, 41.6, 53.9		
α , β , γ (°)	82.2, 80.1, 60.9		
	<i>Peak</i>	<i>Inflection</i>	<i>Remote</i>
Wavelength	1.2824	1.2828	0.9763
Resolution (Å)	30-2.0	30-2.0	30-1.75
R_{merge}	3.6 (17.1)	3.4 (17.6)	4.5 (26.6)
$I / \sigma I$	12.5 (5.3)	12.8 (4.8)	12.7 (3.7)
Completeness (%)	81.8 (40.8)	85.5 (42.6)	93.3 (87.2)
Redundancy	1.2	1.2	2.4
Refinement			
Resolution (Å)	35.37-1.75		
No. reflections	28 332		
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	18.0/23.0		
No. atoms	2566		
Protein	2275		
Ligand/ion	2		
Water	289		
<i>B</i> -factors			
Protein	29.97		
R.m.s. deviations			
Bond lengths (Å)	0.012		
Bond angles (°)	1.261		

Table 1. Crystallographic data and refinement statistics.

The values in parenthesis are for the highest resolution bin.

$R_{\text{merge}} = R_{\text{work}} = \sum_h \sum_i |I_{hi} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_i I_{hi}$, where I_{hi} is the i th observation of the reflection h , while $\langle I_h \rangle$ is the mean intensity of reflection h .

$R_{\text{factor}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$. R_{free} was calculated with a small fraction (5%) of randomly selected reflections.

The R_{free} was calculated from 5% of all data that were not used in the refinement.

bilize the helix–turn–helix motif as a compact globular domain. In addition, *Bs*-PerR-Zn and *Pa*-Fur (Pohl *et al.*, 2003) contain an additional N-terminal helix H1 (residues 5–15 for *Bs*-PerR-Zn and residues 2–9 for *Pa*-Fur) that may be involved in DNA recognition. The C-terminal part

of each PerR-Zn monomer (Fig. 1) consists of a α/β domain with three anti-parallel β -strands (S3, S4 and S5) and two α -helices (H5, H6).

Structure of the zinc binding site

The present data clearly show that one zinc ion is present per monomer and that all four cysteine residues of each monomer are involved in the Zn^{2+} co-ordination. The Zn^{2+} ion is co-ordinated in a tetrahedral fashion with the Zn-S distances ranging from 2.32 Å to 2.36 Å (Fig. 2). As a value of 2.31 Å is expected for a thiolate- Zn^{2+} distance (Simonson and Calimet, 2002), in *Bs*-PerR-Zn the zinc ion is most likely co-ordinated by four thiolates. This zinc binding site, located in the C-terminal domain, consists of two Cys-(Xaa)₂-Cys motifs involving Cys-96, Cys-99 and Cys-136, Cys-139 respectively. The two motifs are connected by a 36-residue-long oligopeptide. Cys-96 is the last residue of the S3 β -strand, while Cys-99 is located on the hairpin between the two S3 and S4 β -strands. Following the polypeptide chain to the C-terminal end, Cys-136 is located in the short coil between the S5 β -strand and the H6 α -helix, while Cys-139 belongs to H6 helix. The tertiary fold of the protein brings the three S3, S4 and S5

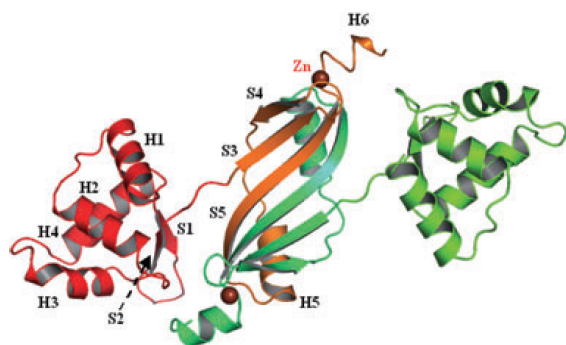


Fig. 1. Ribbon representation of the PerR-Zn dimer crystal structure. Secondary structure elements are annotated in the drawing. View along the non-crystallographic twofold axis. N-terminal and C-terminal domains of monomer A are in red and orange respectively. N-terminal and C-terminal domains of monomer B are in green and light green respectively.

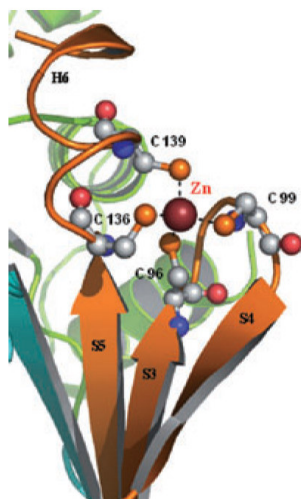


Fig. 2. Zinc binding site and dimerization domain of PerR-Zn. Close-up of the dimerization domain and the zinc binding site of PerR-Zn (monomer A). S3-5 β -strands, H6 helix and the zinc ion are annotated. Metal to cysteine ligand distances are 2.36, 2.31, 2.31 and 2.32 Å for Cys-96, Cys-99, Cys-136, Cys-139 respectively.

β -strands in close proximity so as to form a β -sheet and this arrangement is locked by the zinc binding site (Fig. 2). As the latter three β -strands are part of the dimerization domain, the zinc ion appears to play a crucial structural role in maintaining the stability of the dimer.

Role of the zinc site in the stability of the dimer

To check whether the $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ centre of PerR-Zn plays a structural role, oxidative reactions were performed with H_2O_2 and diamide, a thiol-specific oxidant. Oxidation of the protein was then evaluated by FPLC using a gel filtration column. For these experiments, all buffers were Chelex-treated to avoid any potential Fenton-like reactions which could damage the protein. The dimeric form of PerR elutes as a single peak with an elution volume of 10 ml (Fig. 3 insert). Oxidative treatment with either H_2O_2 or diamide leads to two new products, II and III (a typical profile of these reactions is shown in Fig. 3). The elution volumes observed for II (11.5 ml) and III (7.5 ml) suggest a monomeric and an oligomeric form of the protein respectively. It must be noted that the formation of III is prevented in the presence of a high ionic strength (0.5 M NaCl). Electrospray mass spectrometry analysis of II, obtained with either H_2O_2 or diamide treatment, led to an m/z of $16\,287.5 (\pm 2.0)$ Da which corresponds to the mass of the oxidized monomer. Interestingly, the latter mass value suggests that two disulphide bonds are formed upon oxidative treatment of PerR-Zn. Importantly, metal content analysis by flame atomic absorption revealed that zinc is not present in the oxidized monomer.

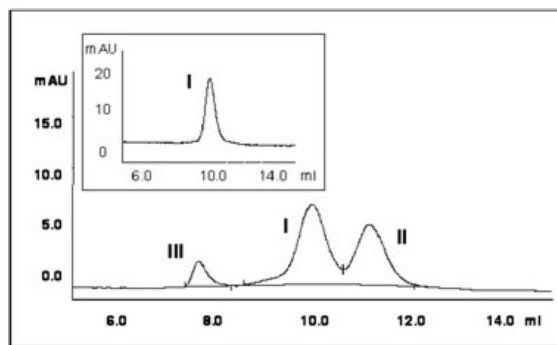


Fig. 3. Typical FPLC profile for the reaction of PerR-Zn with H_2O_2 . Oxidation of PerR-Zn (20 μM) was carried out for 30 min at 37°C , in 100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl solution, in the presence of 100 eq. H_2O_2 . Analysis of the reaction was performed on a gel filtration Superdex-75 column. I, II and III are the dimer, monomer and oligomer species respectively. The profile of the starting dimeric protein is shown in insert.

To assess the decomposition rate constant of PerR-Zn under oxidative conditions, the fractional amount of the dimer was plotted in Fig. 4 as a function of time exposure to H_2O_2 or diamide. The concentration of the unreacted dimer was determined by evaluating the area under the peak in the FPLC chromatogram. The experimental points represent the average of at least three separate experiments. The dimer decomposition rate constant was calculated by fitting the experimental data to the monoexponential decay function: $Y = Y_0 + Ae^{(-kt)}$, where k is the decomposition rate constant. The calculated k -values for the reaction of PerR-Zn with either H_2O_2 or diamide are $0.96 (\pm 0.12)$ and $1.08 (\pm 0.12) \text{ h}^{-1}$ respectively. Both values are within experimental errors, which suggest that the oxidation of the protein with H_2O_2 and diamide

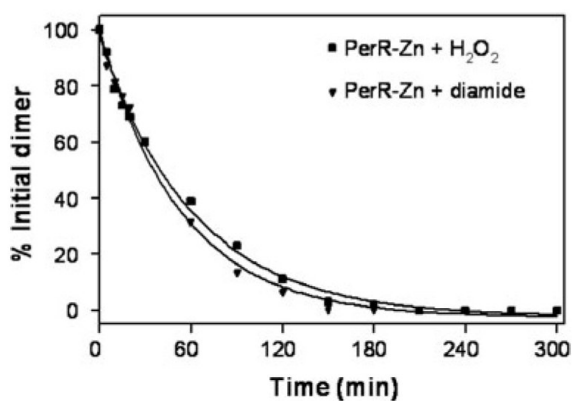


Fig. 4. Determination of the PerR-Zn dimer decomposition rate constant upon oxidative treatment. The fractional amount of dimeric protein (PerR-Zn) is plotted as a function of time of exposure to oxidant (H_2O_2 or diamide). The apparent rate constant for the decomposition of the dimer was estimated by fitting the experimental data with a one-phase exponential decay function.

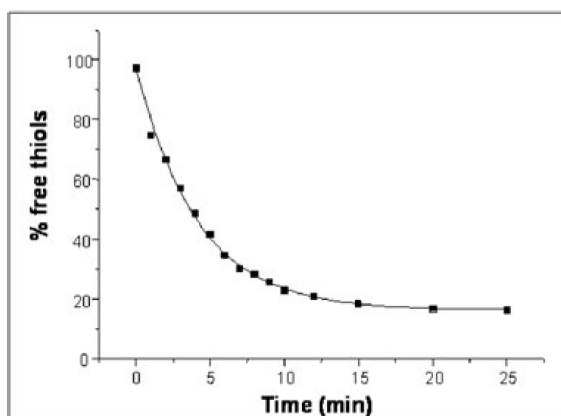


Fig. 5. Free thiol titration with DTNB. The percentage of free thiols is plotted as a function of time of exposure of PerR-Zn to H_2O_2 . The apparent rate constant for the oxidation of the $Zn(Cys)_4$ site was estimated by fitting the experimental data with a one-phase exponential decay function.

proceed similarly. Oxidation of the $Zn(Cys)_4$ site was then examined by titration of free thiols with DTNB in the presence of H_2O_2 . Figure 5 shows the percentage of thiols titrated with DTNB versus time exposure to H_2O_2 of PerR-Zn. As shown, more than 80% of the thiols are oxidized within 25 min with an estimated rate constant of $0.24 (\pm 0.01) \text{ min}^{-1}$. This result confirms that the oxidized monomer species contains two disulphide bonds in agreement with the mass spectrometry analysis. Altogether these results demonstrate that the zinc ion in PerR-Zn plays a largely structural role because its loss upon oxidation of the four cysteine residues leads to the unfolding of the dimer.

Discussion

Overall structure

The present study provides the first structural description of a Fur-like metalloregulator, PerR from *B. subtilis*, involved in the regulation of the inducible peroxide stress response. Until now, the only structural information on a Fur protein, offered by Pohl *et al.* (2003), describes the structure of the Fur from *P. aeruginosa*. This work revealed significant similarities with related iron-dependent regulators, DtxR from *C. diphtheriae* (Pohl *et al.*, 1998, 1999b) and IdeR from *M. tuberculosis* (Pohl *et al.*, 1999a). Although there is only 26% sequence homology between *Pa-Fur* and *Bs-PerR*, the two proteins present structural similarities notably in the DNA-binding and the dimerization domains. Superposition of *Pa-Fur* and *Bs-PerR*-Zn N-terminal domains leads to an r.m.s. deviation of 1.41 Å (Fig. S3). Furthermore, the two putative DNA binding helices H4 of both regulators superim-

pose well with an r.m.s. deviation of 0.27 Å. Such a high structural similarity is also found for the α/β dimerization domain of both proteins. The 44 structurally equivalent C_α -atoms of strands S3, S4, S5 and helix H5, superimpose with an r.m.s.d. of 2.6 Å (Fig. S4).

PerR contains a $Zn(Cys)_4$ structural motif

The most striking structural difference between *Bs-PerR*-Zn and *Pa-Fur* resides in the zinc binding site. Indeed, as revealed by the present study, the zinc ion in PerR is bound by four cysteines. By contrast, in the reported structure of *Pa-Fur*, two histidine (His-32, His-89) and two glutamate (Glu-80, Glu-100) residues co-ordinate the zinc ion (Pohl *et al.*, 2003). It is noteworthy that *Pa-Fur* is an exception within the Fur family because it lacks the Cys-95 and therefore the zinc avid Cys-(Xaa)₂-Cys motif (involving Cys-92, Cys-95 in *Ec-Fur* notation) which is found in most Fur proteins. Previous work in our laboratory has shown that this motif is indeed involved in zinc binding in *Ec-Fur*, the zinc co-ordination being complemented probably by two histidines residues (Jacquemet *et al.*, 1998; Gonzalez de Peredo *et al.*, 1999). Therefore, the two other cysteines of *Ec-Fur* protein which belong to a Cys-(Xaa)₄-Cys motif (involving Cys-132, Cys-137 in *Ec-Fur* notation and conserved in many Fur proteins from various origins) are not involved in metal binding. The present study has revealed that the $Zn(Cys)_4$ site in PerR-Zn locks together the three S3, S4 and S5 β -strands of each monomer to form the two parts of the dimer β -sheet. The importance of this structural role was confirmed through oxidation of the four cysteine residues which leads to the formation of two disulphide bonds, the zinc release and after all to the dimer disruption (Figs 3–5). Interestingly, sequence alignments of twenty PerR-like proteins from a wide variety of microorganisms reveal that the four cysteine residues are absolutely conserved and strictly organized as two Cys-(Xaa)₂-Cys motifs (Fig. S5, with Cys-96, Cys-99 and Cys-136, Cys-139 for *Bs-PerR*). Owing to the present structural results and the well-documented zinc avidity of the Cys-(Xaa)₂-Cys motif, it is likely that all these proteins contain a structural $Zn(Cys)_4$ site which may then appear as a distinctive feature of the PerR-like metalloregulators.

A model for the active form of PerR

In spite of the structural homologies between *Pa-Fur* and *Bs-PerR*, the overall dimer structures are different. This is illustrated in Fig. 6, where the superposition of the two central α/β motifs of both proteins leads to a divergent orientation of the two respective DNA-binding motifs. The relative orientation on opposite sides of the two H4 and H4' helices of PerR-Zn (in red in Fig. 6), forced by the

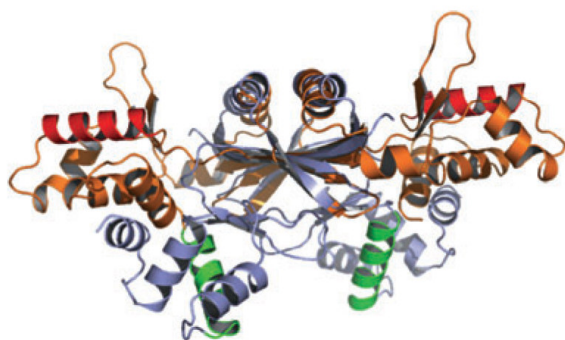


Fig. 6. Superposition of *Bs*-PerR-Zn and *Pa*-Fur. Comparison of the global dimer structure of *Bs*-PerR-Zn (orange with H4 helices in red) and *Pa*-Fur (blue with H4 helices in green) using the dimerization domains as the superposition matrix.

nearly flat structure of the protein, clearly shows that PerR-Zn cannot interact with DNA. In contrast, the structure of active *Pa*-Fur brings together the two putative DNA-binding helices H4 and H4' with an almost perpendicular orientation which allows their interaction with DNA (in green in Fig. 6) (Pohl *et al.*, 2003). A crucial point to address is how the present PerR-Zn structure can account for the structure of the active protein which interacts with DNA upon binding the regulatory metal. Towards this goal, we built a model for the active PerR protein (Fig. 7A). The DALI algorithm [structural comparisons based on Distance matrix ALIGNment (Holm and Sander, 1996)] was used to perform structural comparisons between PerR-Zn and the available structures in the Protein Data Bank (PDB). The closest homologue of PerR-Zn was found to be *Pa*-Fur (Z-score of 13). As already mentioned, the similarities between both proteins are particularly located in the N-terminal domains (residues 1–88) with a Z-score of 13 and an r.m.s.d. of 1.4 Å for the 82 common C α -atoms. The C-terminal domain of PerR-Zn (residues 89–144) was then compared separately with all protein folds in the PDB using DALI. Interestingly, only the *Pa*-Fur structure showed a Z-score value greater than 4.5. According to these two DALI hits the structural analysis by superposition of both independent domains of *Bs*-PerR-Zn with *Pa*-Fur leads to a model of the active PerR protein. This new model differs from PerR-Zn by a 160° rotation of the C-terminal domain towards the N-terminal end, and leads to a Z-score of 14.5 with an r.m.s.d. of 2.4 Å for the 130 common residues with *Pa*-Fur (Fig. S6). Interestingly the modelled PerR structure reveals that five residues (His-37, His-91, His-93, Asp-85 and Asp-104), conserved among the PerR-like family members (Fig. S5), are suitably located and are thus likely to form a high affinity binding site for the regulatory metal (Fig. 7B). This potential regulatory metal site is consistent with the recent results reported by Lee and

Helmann (2006) who indicated through mutational analyses that the latter five residues proposed to be Fe²⁺ or Mn²⁺ ligands are essential for the repressor function of PerR *in vivo*.

By providing a five donor binding site PerR might have a strong affinity for Fe²⁺. Moreover, it is noteworthy that among the five ligands, four belong to the C-terminus while one (His-37) belongs to the N-terminal domain of the protein. Therefore, the binding of His-37 onto the iron brings the N- and C-termini in close proximity so that the protein wraps around the regulatory metal which locks together the N- and C-terminal domains to allow for DNA binding. Conversely, peroxide oxidation of His-37 may abolish its iron binding ability and its dissociation from the metal would disrupt the DNA binding form of PerR that would adopt a relaxed structure similar to the presently reported PerR-Zn form.

Conclusion

A few zinc cysteine redox switches have been described in the recent past and associated to a wide range of biological functions, many of them related to the oxidative

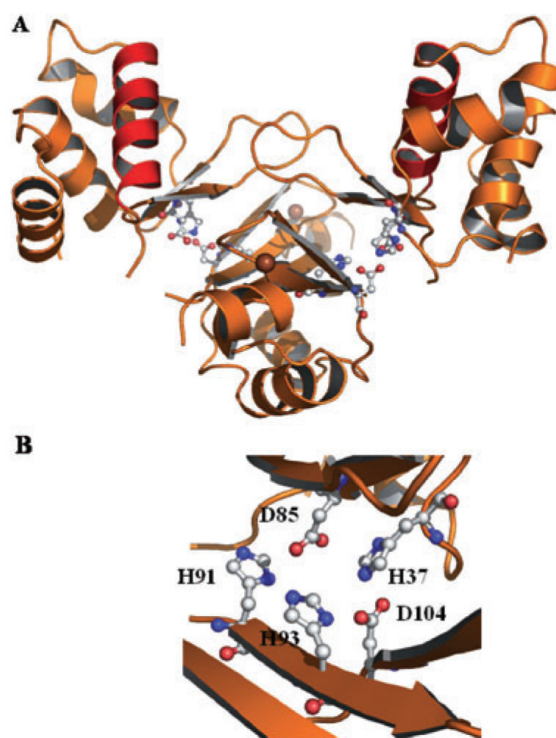


Fig. 7. Structural model of the active PerR protein. A. Ribbon representation of the PerR dimer with the two putative DNA binding helices in red. The two zinc atoms are in brown. The five residues of the potential regulatory metal binding site are indicated. B. Close-up of the regulatory metal binding site.

and the disulphide stress defences (Paget and Buttner, 2003; Barford, 2004). One of the best-characterized examples is the heat shock protein Hsp33 that behaves as a molecular chaperone and is activated in response to a redox stress. Jakob and coworkers showed that the reduced Hsp33 monomer contains a Zn(Cys)₄ site which releases the Zn²⁺ ion upon oxidation and consequently forms the oxidized dimer which is the active form of the chaperone (Jakob *et al.*, 1999; 2000; Barbirz *et al.*, 2000; Graumann *et al.*, 2001). In the case of the peroxide sensor PerR we have shown that the Zn(Cys)₄ site is oxidized in the presence of millimolar concentrations of H₂O₂, a level well above that needed to inactivate the PerR-Zn-Fe protein. Thus it is unlikely that oxidation of the Zn(Cys)₄ site would contribute, *in vivo*, to the inactivation of the protein and the subsequent induction of the peroxide stress response. In the case of an excess of Mn²⁺, as PerR-Zn-Mn is much less sensitive to H₂O₂ than PerR-Zn-Fe, oxidation of the zinc binding site may contribute to PerR-Zn-Mn inactivation under strong oxidative conditions. However, this hypothesis requires confirmation *in vivo*.

In summary, the present study has demonstrated that *B. subtilis* PerR possesses a Zn(Cys)₄ site which is crucial to stabilize the dimeric form of the protein. Sequence homologies of twenty PerR and PerR-like proteins, known to be involved in peroxide sensing in various organisms, strongly suggest that this Zn(Cys)₄ site is a distinctive feature of this class of peroxide regulators. Based on our structural data and the related *Pa*-Fur structure, we present a model of PerR which possesses a potential binding site for the regulatory metal and that may represent the active form of the protein that binds the DNA. Efforts are now directed at crystallizing the active protein and its DNA adduct.

Experimental procedures

Protein expression and purification

The *B. subtilis* *perR* gene was inserted between NdeI and XhoI restriction sites of pET-30c vector (Novagen). After sequence verification of each strand, the plasmid was introduced into *E. coli* BL21(DE3) competent cells (Sigma). The cells were grown aerobically at 37°C in 1 l of LB medium, containing 50 µg ml⁻¹ kanamycin, until 0.6 OD at 600 nm. Production of PerR was induced by adding 1 mM IPTG, followed by 3 h incubation at 37°C. Cultures were then centrifuged at 5000 *g* for 10 min. From this point, all steps were performed at 4°C. Cells were resuspended in 30 ml of 100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT (buffer A) prior to sonication. The cell lysate was then centrifuged for 30 min at 35 000 *g*. The resulting supernatant was directly loaded onto a MonoQ column (Amersham Biosciences). Proteins were eluted with a linear gradient of 0.05–1 M NaCl in buffer A. The fractions containing PerR were pooled and concentrated by ammonium sulphate pre-

cipitation (80%) at 4°C overnight. After centrifugation at 25 000 *g* for 45 min, the pellet was resuspended in 4 ml 100 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 5 mM DTT and subjected to gel filtration using a Superdex-75 16/60 column (Amersham Biosciences). The fractions containing the dimeric protein were then collected and stored at –80°C. The concentration of PerR was calculated using an extinction coefficient of 9020 M⁻¹ cm⁻¹ at 277 nm.

Atomic absorption spectrometry

Prior to analysis, all the samples were buffer exchanged into Chelex-100 (Bio-Rad) treated 100 mM Tris-HCl pH 8. Buffer exchange was performed by using NAP-5 columns (Amersham Biosciences). The amount of zinc was determined by flame atomic absorption spectrometry (Perkin Elmer 560 Norwalk) using an external calibration curve. Mn²⁺ content of PerR-Zn-Mn was determined by electrothermal atomic absorption spectrometry (Hitachi 8270, Tokyo, Japan) using a Zeeman background correction and matrix matched external calibration curve.

Crystallization and structure determination

Screening of the crystallization conditions was initially performed with the TECAN robot using various commercial screens of Hampton Research and Qiagen. Crystals were obtained at 20°C with 20% PEG 6000, 1 M LiCl, and 0.1 M Tris-HCl pH 8 of the PEG–LiCl screen from Hampton Research. Crystals were then optimized and grown at 20°C from a 1:1 µl mixture of a 10 mg ml⁻¹ protein solution (100 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 5 mM DTT, 2 mM EDTA) with 25% PEG 6000, 1.5 M LiCl, 0.1 M Tris-HCl pH 8. For data collection, the crystals were transferred into a solution composed of the mother liquor and 25% glycerol as cryoprotectant. PerR-Zn structure was determined using MAD X-ray diffraction data at 1.75 Å resolution collected around the Zn edge at 100 K on beam line FIP-BM30A (Roth *et al.*, 2002) of the European Synchrotron Radiation Facility. Data reduction was performed with the XDS program (Kabsch, 1993). The space group was P1 (*a* = 40.8 Å, *b* = 41.6 Å, *c* = 53.9 Å, α = 82.2°, β = 80.1°, γ = 60.9°) with potentially two molecules per asymmetric unit (solvent content of 50%). Two Zn atom sites were found with the SOLVE program (Terwilliger and Berendzen, 1999) confirming the presence of two molecules in the asymmetric unit. After phase extension and solvent flattening with the RESOLVE program (Terwilliger and Berendzen, 1999), the quality of the electron density map allowed the automated construction of 87 residues out of 288 (using RESOLVE program). The model was completed manually with the COOT molecular modelling package (Emsley and Cowtan, 2004). The refinement of this initial model was carried out with the Refmac5 program (Collaborative Computational Project, 1994) in the 30–1.75 Å resolution range without any NCS restraints. The final model contains residues His-4 to Asn-144 from monomer A and Ala-2 to Gly-145 from monomer B, both present in the asymmetric unit as well as 289 water molecules. The electron density is very well defined except for residues 49–53, 77–81 and 142–145 from monomer B located on a loop exposed to solvent. All residues

fall within the allowed regions of the Ramachandran plot as defined by the PROCHECK program (Laskowski *et al.*, 1993). Statistics for all the data collections and refinement of the different structures are summarized in Table 1. The atomic co-ordinates and structure factors for PerR-Zn have been deposited into the PDB under the accession number 2FE3.

Protein oxidation and determination of the decomposition rate constants

Chemical reactions and FPLC analyses were performed with Chelex-100 treated buffers. Oxidative reactions were carried out at 37°C in 100 µl solution of 100 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, containing 20 µM of PerR-Zn in the presence of 100 eq. H₂O₂. For the reaction between PerR-Zn and diamide a 1/100 (protein/oxidant) ratio was also used. The samples were subjected to FPLC analysis using a gel filtration Superdex 75 HR10/30 analytical column (Amersham Biosciences) with a linear gradient of 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl. The chromatograms were visualized and the different peaks were quantified using Unicorn software (Amersham Biosciences). The rate constant for the dimer decomposition was calculated by fitting the time evolution of the dimeric fraction to a one-phase exponential decay function.

DTNB titration of free thiols

The amount of thiol groups remaining in solution after exposure to H₂O₂ was determined by the Ellman's reagent (DTNB) using the $E_{412\text{nm}} = 13\,500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (calculated with B-mercaptoethanol). PerR (15 µM) was incubated with 100 eq. H₂O₂ for different times; reactions were stopped at different intervals by addition of 2 µl of HCl (1 M) into 10 µl reaction mixtures. Samples were neutralized by dilution (1:10) in a solution containing HEPES (1 M, pH 7.4) and DTNB (5 mM). Absorbance at 412 nm was immediately recorded.

Acknowledgements

We thank Josiane Arnaud for atomic absorption analyses, Christine Saint-Pierre for MALDI-TOF mass spectrometry measurements, David Lemaire for ESI-mass spectrometry analyses and Ludovic Champier for his help in cloning experiments during the initial stage of this work.

References

- Barbirz, S., Jakob, U., and Glocker, M.O. (2000) Mass spectrometry unravels disulfide bond formation as the mechanism that activates a molecular chaperone. *J Biol Chem* **275**: 18759–18766.
- Barford, D. (2004) The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 679–686.
- Boylan, J.A., Posey, J.E., and Gherardini, F.C. (2003) Borrelia oxidative stress response regulator, BosR: a distinctive Zn-dependent transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11684–11689.
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P., and Helmann, J.D. (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* **29**: 189–198.
- Chen, L., and Helmann, J.D. (1995) *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps (PexB) homologue: evidence for metallorepression of an oxidative-stress gene. *Mol Microbiol* **18**: 295–300.
- Chen, L., James, L.P., and Helmann, J.D. (1993) Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions. *J Bacteriol* **175**: 5428–5437.
- Chen, L., Keramati, L., and Helmann, J.D. (1995) Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8190–8194.
- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., and Ryu, S. (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105**: 103–113.
- Collaborative Computational Project No. 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst D* **50**: 760–763.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2126–2132.
- Fuangthong, M., Herbig, A.F., Bsat, N., and Helmann, J.D. (2002) Regulation of the *Bacillus subtilis* fur and perR genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J Bacteriol* **184**: 3276–3286.
- Gonzalez de Peredo, A., Saint-Pierre, C., Adrait, A., Jacquamet, L., Latour, J.-M., Michaud-Soret, I., and Forest, E. (1999) Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from *Escherichia coli*: chemical modification and mass spectrometry analysis. *Biochemistry* **38**: 8582–8589.
- Graumann, J., Lilie, H., Tang, X., Tucker, K.A., Hoffmann, J.H., Vijayalakshmi, J., *et al.* (2001) Activation of the redox-regulated molecular chaperone Hsp33: a two-step mechanism. *Structure* **9**: 377–387.
- Hahn, J.-S., Oh, S.-Y., Chater, K.F., Cho, Y.-H., and Roe, J.-H. (2000) H₂O₂-sensitive Fur-like repressor CatR regulating the major catalase gene in *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* **275**: 38254–38260.
- Herbig, A.F., and Helmann, J.D. (2001) Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* **41**: 849–859.
- Holm, L., and Sander, C. (1996) Mapping the protein universe. *Science* **273**: 595–603.
- Horsburgh, M.J., Clements, M.O., Crossley, H., Ingham, E., and Foster, S.J. (2001) PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**: 3744–3754.
- Huffman, J.L., and Brennan, R.G. (2002) Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 98–106.
- Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J.-L., Latour, J.-M., and Michaud-Soret, I. (1998) X-ray absorp-

- tion spectroscopy of a new zinc site in the Fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**: 2564–2571.
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M., and Bardwell, J.C. (1999) Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96**: 341–352.
- Jakob, U., Eser, M., and Bardwell, J.C. (2000) Redox switch of Hsp33 has a novel zinc binding motif. *J Biol Chem* **275**: 38302–38310.
- Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst* **26**: 795–800.
- Kim, S.O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W.F. Jr, Keng, T., De Angelo, J., *et al.* (2002) OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* **109**: 383–396.
- King, K.Y., Horenstein, J.A., and Caparon, M.G. (2000) Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **182**: 5290–5299.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* **26**: 283–291.
- Lee, J.W., and Helmann, J.D. (2006) The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalyzed histidine oxidation. *Nature* **440**: 363–367.
- Mongkolsuk, S., and Helmann, J.D. (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol Microbiol* **45**: 9–15.
- Ortiz de Orué Lucana, D., and Schrepf, H. (2000) The DNA-binding characteristics of the *Streptomyces reticuli* regulator FurS depend on the redox state of its cysteine residues. *Mol Gen Genet* **264**: 341–353.
- Paget, M.S., and Buttner, M.J. (2003) Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* **37**: 91–121.
- Pohl, E., Holmes, R.K., and Hol, W.G. (1998) Motion of the DNA-binding domain with respect to the core of the diphtheria toxin repressor (DtxR) revealed in the crystal structures of apo- and holo-DtxR. *J Biol Chem* **273**: 22420–22427.
- Pohl, E., Holmes, R.K., and Hol, W.G. (1999a) Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *J Mol Biol* **285**: 1145–1156.
- Pohl, E., Holmes, R.K., and Hol, W.G. (1999b) Crystal structure of a cobalt-activated diphtheria toxin repressor-DNA complex reveals a metal-binding SH3-like domain. *J Mol Biol* **292**: 653–667.
- Pohl, E., Haller, J.C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E., and Vasil, M.L. (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**: 903–915.
- Roth, M., Carpentier, P., Kaikati, O., Joly, J., Charrault, P., Pirocchi, M., *et al.* (2002) FIP: a highly automated beamline for multiwavelength anomalous diffraction experiments. *Acta Cryst* **D58**: 805–814.
- Schoneich, C. (2000) Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxo-histidine in peptides and proteins. *J Pharm Biomed Anal* **21**: 1093–1097.
- Simonson, T., and Calimet, N. (2002) Cys(x)His(y)-Zn²⁺ interactions: thiol versus thiolate coordination. *Proteins* **49**: 37–48.
- Storz, G., and Imlay, J.A. (1999) Oxidative stress. *Current Opinion Microbiol* **2**: 188–194.
- Terwilliger, T.C., and Berendzen, J. (1999) Automated structure solution for MIR and MAD. *Acta Cryst* **D55**: 849–861.
- Uchida, K., and Kawakishi, S. (1993) 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *FEBS Lett* **332**: 208–210.
- Uchida, K., and Kawakishi, S. (1994) Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H₂O₂. Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine 118. *J Biol Chem* **269**: 2405–2410.
- van Vliet, A.H., Baillon, M.L., Penn, C.W., and Ketley, J.M. (1999) *Campylobacter jejuni* contains two Fur homologs: characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR repressor. *J Bacteriol* **181**: 6371–6376.
- Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**: 1718–1721.
- Zheng, M., Wang, X., Doan, B., Lewis, K.A., Schneider, T.D., and Storz, G. (2001a) Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 4571–4579.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A., and Storz, G. (2001b) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**: 4562–4570.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Fig. S1. Purification of PerR-Zn.

Fig. S2. Metal-dependent DNA binding of PerR-Zn.

Fig. S3. Superposition of the N-terminal domains.

Fig. S4. Superposition of PerR-Zn (orange) and *Pa*-Fur (blue) dimerization domains.

Fig. S5. CLUSTALW alignment of *Bs*-PerR with selected PerR-like proteins.

Fig. S6. Model of the active PerR protein (for clarity only one monomer is represented).

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

III. Discussion.

Au sein des protéines, le zinc est généralement coordonné à quatre ligands. Parmi les sites recensés, on compte les motifs contenant : deux cystéines et deux histidines, trois cystéines et une histidine ou encore quatre cystéines comme c'est le cas pour PerR. La fonction de ces différents sites à zinc est généralement décrite comme une fonction purement structurale. Cependant, leur sensibilité vis-à-vis d'espèces oxydantes telles que le peroxyde d'hydrogène a été proposée et démontrée. Au sein de ces motifs, le zinc est lié de manière réversible en fonction de l'état redox des fonctions thiols ; l'activation ou l'inactivation de la protéine est alors fonction de leur état d'oxydation (formation d'un ou de deux ponts disulfure) et donc de l'absence ou de la présence du Zn^{2+} . Parmi ces protéines, on peut citer les protéines à « doigt de zinc » tels que les membres de la famille Sp1 (Wu *et al.*, 1996), les métallothionéines impliquées dans le stockage du zinc (Jacob *et al.*, 1998; Maret & Vallee, 1998), la protéine kinase C (Knapp & Klann, 2000; Korichneva *et al.*, 2002), le facteur anti-sigma RsrA (Li *et al.*, 2003) ainsi que des chaperonnes moléculaires telles que Hsp33 (Ilbert *et al.*, 2006).

Le cas de la protéine Hsp33 d'*E. coli* a été très bien étudié dans la littérature. Comme la protéine PerR, Hsp33 présente un site à zinc du type $Zn(Cys)_4$. La forme réduite, inactive de Hsp33, est activée après réaction avec H_2O_2 . Nous détaillerons, ci-dessous, les principales caractéristiques de cette protéine.

Hsp33 joue un rôle clé dans la réponse cellulaire vis-à-vis d'un stress thermique et d'un stress oxydant. En effet, au niveau transcriptionnel, l'expression de Hsp33 est sous le contrôle d'un stress thermique mais son activité post-traductionnelle est dépendante d'un stress oxydant et notamment en réponse à H_2O_2 (Winter *et al.*, 2005). Dans ces conditions, l'activité chaperonne de Hsp33 permet d'éviter l'agrégation irréversible de nombreuses protéines dont au moins 80% des protéines sensibles à l'agrégation chez *E. coli* (Jakob *et al.*, 1999 ; Winter *et al.*, 2005).

Des études biochimiques ont montré que l'atome de zinc de Hsp33 est coordonné par les quatre cystéines présentes au sein du domaine C-terminal et organisées selon le motif $C_{232}XC_{234}X_{(27-32)}C_{265}XXC_{268}$ (X représente un acide aminé non conservé). Dans le cas d'Hsp33 d'*E. coli*, le site présente une forte affinité pour le zinc avec une constante de dissociation (K_d) de l'ordre de 10^{-17} M (Jakob *et al.*, 2000). Cette forte affinité pour le zinc permet de stabiliser le domaine C-terminal et de maintenir la protéine monomérique sous sa

forme réduite inactive en conditions normales. Ces données ont été confirmées par la résolution de la structure cristallographique du domaine C-terminal de Hsp33 d'*E. coli* (Won *et al.*, 2004). Cette structure montre que le zinc est coordonné par les quatre cystéines conservées selon une géométrie tétraédrique (Figure II.6).

Dans cet exemple, le site à zinc joue un double rôle. D'une part, il augmente la stabilité de la protéine vis-à-vis de la protéolyse (Jakob *et al.*, 2000). D'autre part, il est impliqué dans le processus d'activation de Hsp33 par H_2O_2 . En effet, les quatre cystéines qui coordonnent le zinc sont oxydées par H_2O_2 en ponts disulfure entraînant alors le relargage du métal (Barbirz *et al.*, 2000; Graumann *et al.*, 2001; Jakob *et al.*, 1999).

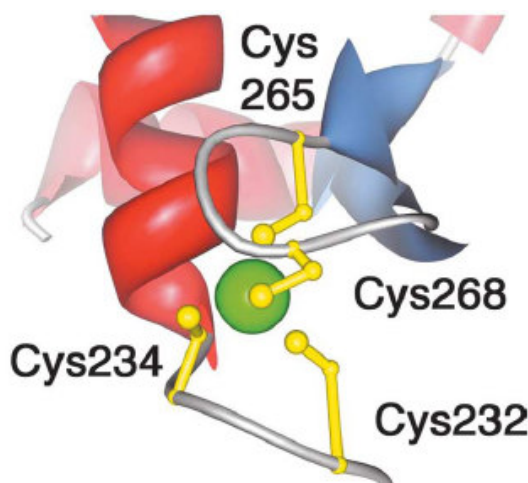


Figure II.6 : zoom de la structure cristallographique de Hsp33 d'*E. coli* au niveau du site à zinc (Won *et al.*, 2004).

Jakob *et al.* ont montré que la coordination du zinc au niveau des cystéines permettait à ces dernières de réagir plus rapidement avec H_2O_2 et maintenait ces résidus dans un alignement optimal pour la formation de deux ponts disulfure entre les résidus C_{232} , C_{234} et C_{265} , C_{268} (Jakob *et al.*, 2000). En effet, une forme réduite d'Hsp33 contenant un atome de zinc réagit plus vite qu'une forme réduite ne contenant pas de zinc. Le zinc en se comportant comme un acide de Lewis permet d'augmenter la réactivité des cystéines en les maintenant sous leur forme thiolate (pKa plus faible, (Paget & Buttner, 2003).

Une étude plus récente basée sur des mutants de la protéine a permis de préciser le rôle de ce site à zinc dans l'activité de la protéine (Graf *et al.*, 2004). Ce site structural « bloque » la protéine dans une configuration où le domaine de liaison du substrat n'est pas accessible. Il permet également de maintenir la protéine sous forme monomère en empêchant tout contact

entre les domaines de dimérisation des deux monomères. Ces données expliquent donc la présence de Hsp33 sous forme monomère, inactive, en absence de stress oxydant.

Lors de son processus d'activation, Hsp33 va évoluer consécutivement sous trois formes qui diffèrent selon son état oligomérique (Graf *et al.*, 2004). La première forme est un monomère inactif qui lie le zinc. Le site à zinc bloque le domaine C-terminal dans une conformation en hélice α très compacte. La seconde forme est un monomère oxydé partiellement actif ; la perte du zinc suite à la formation des deux ponts disulfure permet un réarrangement de l'extrémité C-terminale suffisant pour permettre une exposition du domaine de liaison du substrat mais pas du domaine de dimérisation. Enfin la troisième et dernière forme est un dimère oxydé totalement actif ; le réarrangement de la partie C-terminale se poursuit, les domaines de dimérisation de chaque monomère peuvent alors interagir (Figure II.7).

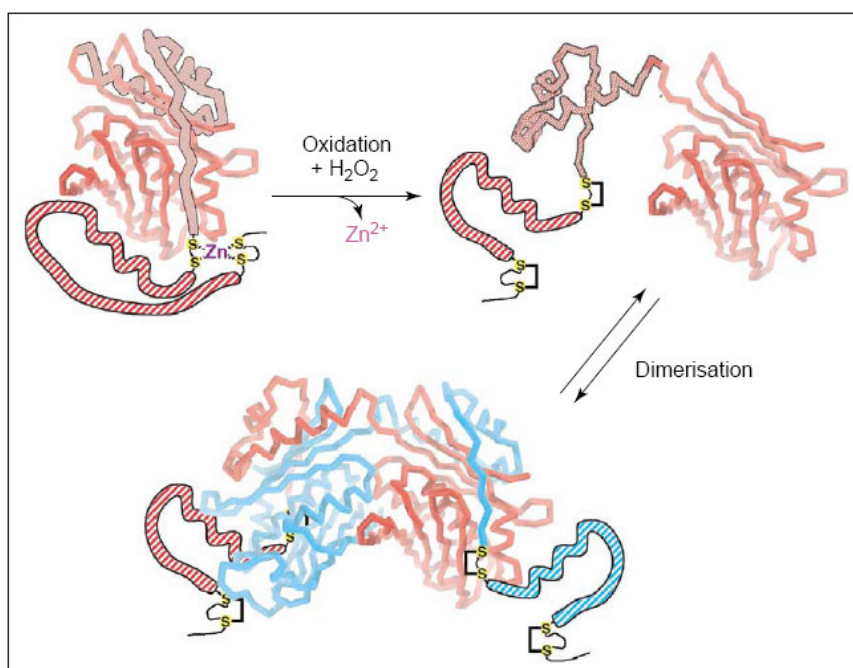


Figure II.7: cycle d'oxydation de Hsp33. L'oxydation des cystéines C-terminales (S) conduit au relargage du zinc, puis au processus de dimérisation. Ces changements conformationnels permettent l'exposition du domaine de liaison du substrat (Barford, 2004).

La réaction du peroxyde d'hydrogène avec les cystéines du site à zinc conduit à la formation de ponts disulfure responsables de l'activation de Hsp33. Comme nous l'avons vu précédemment, PerR présente un site à zinc du type $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ analogue à celui de Hsp33. Une réactivité similaire à celle d'Hsp33 pouvait donc être légitimement attendue pour le site à zinc

de PerR. De plus, une des premières hypothèses formulées par le groupe de J.D. Helmann présentait l'oxydation des cystéines comme étant responsable de l'activation de PerR (Herbig & Helmann, 2001). Par ailleurs, pour d'autres protéines « PerR-like » telles que CatR (Hahn *et al.*, 2000) et FurS (Lucana *et al.*, 2003), un tel mécanisme est également proposé. D'autre part, l'activation de nombreux senseurs d'H₂O₂ tels que OxyR, RsrA, Yap1-Orp1 implique l'oxydation de cystéines réactives en pont disulfure (Barford, 2004; Kiley & Storz, 2004; Toledano *et al.*, 2004). Nos premières hypothèses de travail se sont donc orientées dans l'étude de la réactivité de ces résidus cystéine comme étant les résidus responsables de l'activation de PerR par H₂O₂. Les expériences de biochimie décrites dans l'article paru dans Molecular Microbiology ont montré que la cinétique d'oxydation de ce site à zinc est trop lente pour rendre compte de l'activité de senseur d'H₂O₂ de PerR *in vivo*. En effet, ce site est moins réactif que des cystéines libres qui représentent la majeure partie des petites molécules à fonction thiol présentes chez la bactérie *B. subtilis* (Imlay, 2003). Nos données structurales et biochimiques sont donc cohérentes avec un site à zinc purement structural.

Ce résultat a été confirmé par des travaux récents du groupe de J.D. Helmann. Dans une première étude publiée dans la revue Nature, les auteurs ont proposé la coordination du zinc par les quatre cystéines de la protéine (Lee & Helmann, 2006a). En réalisant la mutation de ces résidus en sérine, ce groupe a montré que la protéine est inactivée, et que ces cystéines sont essentielles à l'activité de répresseur de PerR. Dans une seconde étude, la réactivité de ce site à zinc a été étudiée de manière plus détaillée afin de mieux déterminer son rôle, *in vivo et in vitro*, dans la détection d'H₂O₂ (Lee & Helmann, 2006b). Des expériences *in vitro* de migration sur gel SDS-PAGE dénaturant indiquent que, après exposition à de fortes concentrations de H₂O₂ (10 mM et 100 mM), les cystéines 96 et 99 de la protéine apo-PerR-Zn s'oxydent en acide sulfonique. Les auteurs ont également observé la formation de pont disulfure entre les cystéines 96 et 99 et/ou entre les cystéines 136 et 139. Cependant, la concentration en H₂O₂ utilisée est largement supérieure aux concentrations physiologiques. De plus, le relargage du zinc de la forme PerR-Zn, après réaction avec H₂O₂, a été mis en évidence par complexation avec le PAR (4-(2-pyridylazo)résorcinol). La cinétique d'oxydation ainsi déterminée est très lente (constante de vitesse égale à 0.054 M⁻¹s⁻¹) en comparaison à l'oxydation des cystéines libres présentes chez *B. subtilis* (constante de vitesse comprise entre 2 et 20 M⁻¹s⁻¹) et cela même en présence d'une concentration élevée en agents dénaturants comme l'urée (constante de vitesse égale à 0.119 M⁻¹s⁻¹). L'oxydation des cystéines des formes métallées de la protéine (PerR-Zn-Fe et PerR-Zn-Mn) a également été étudiée, *in vitro*, dans des expériences d'alkylation par l'AMS ((acide 4-acetamido-4'-

maleimidylstilbène-2,2'-disulfonique) suivie par une analyse sur gel SDS-PAGE dénaturant) ou par l'iodoacétamide (suivie d'une analyse en spectrométrie de masse). Ces expériences indiquent qu'une oxydation totale du site à zinc est observée pour une concentration de H_2O_2 égale à 100 mM. En conclusion, l'oxydation du site à zinc des formes apo ou métallée de la protéine PerR n'a lieu, *in vitro*, que dans des conditions drastiques. Toutefois, les auteurs ont proposé que l'oxydation de ce site est possible, *in vivo*, lorsque la protéine est sous la forme PerR-Zn-Mn. En effet, cette forme est beaucoup moins sensible (d'un facteur 10^4) à H_2O_2 que la forme à fer. Des concentrations plus importantes en H_2O_2 sont donc nécessaires pour son inactivation. Cette hypothèse très intéressante suggère donc deux modes d'inactivation de PerR dépendant du métal présent au sein du site de régulation et des concentrations en espèce oxydante. Cependant, l'oxydation de PerR-Zn-Mn (milieu enrichi en Mn), *in vivo*, par 10 mM H_2O_2 ne provoque pas de modification au niveau des cystéines mais entraîne une oxydation des histidines du site de régulation (voir mécanisme de régulation présenté dans l'introduction). Ce résultat est cohérent avec l'oxydation de la forme PerR-Zn-Fe. Une explication possible avancée par le groupe de J.D. Helmann est le relargage dans la cellule de fer libre suite au stress oxydant imposé par H_2O_2 (oxydation des clusters fer-soufre par exemple (Imlay, 2006)). Le manganèse au sein de la protéine va alors être échangé par le fer « libre » générant ainsi une forme PerR-Zn-Fe qui est ensuite oxydée par H_2O_2 . La mesure des affinités de PerR pour le Mn^{2+} et pour le Fe^{2+} (expériences de fixation de l'ADN suivies par anisotropie de fluorescence) va dans le sens de cette hypothèse. En effet, PerR présente une affinité beaucoup plus forte pour le Fe^{2+} (constante de dissociation $K_d = 0.1 \mu\text{M}$) que pour le Mn^{2+} ($K_d = 2.8 \mu\text{M}$).

L'ensemble des données biochimiques obtenues *in vitro* et *in vivo* indiquent que les cystéines de PerR ne sont pas impliquées dans le mécanisme de détection du peroxyde d'hydrogène, confirmant un rôle uniquement structural pour le site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ de PerR.

De façon intéressante, des alignements de séquence d'une vingtaine de protéines « PerR-like » de différents organismes (Figure II.8) montrent que les quatre cystéines impliquées dans la liaison du zinc sont parfaitement conservées selon deux motifs identiques CysX_2Cys . On peut donc envisager que ces protéines contiennent un site à zinc structural du type $\text{Zn}(\text{Cys})_4$. Celui-ci constituerait donc la « signature » des métallorégulateurs « PerR-like » senseurs d' H_2O_2 .

Parmi ceux-ci, la protéine FurS de *Streptomyces reticuli*, sous sa forme réduite et en présence de Mn^{2+} ou de Fe^{2+} , agit comme un répresseur de la transcription *in vivo*. Lors d'un stress oxydant, la protéine est oxydée et il y a levée de répression (Lucana & Schrenpf, 2000). Les dernières études biochimiques menées sur FurS (Lucana *et al.*, 2003) suggèrent un site de liaison du zinc différent du motif $Zn(Cys)_4$. En effet, les auteurs ont montré, par l'étude de mutants, que la cystéine 96 ainsi que les histidines 92 et 93 étaient nécessaires à la fixation du zinc par la protéine. Les résultats indiquent que l'activation de la protéine a lieu au niveau du site à zinc par la formation d'un pont disulfure impliquant la cystéine 96. Cependant, la nécessité du second métal (Mn^{2+} ou Fe^{2+}) pour l'activité de répression n'est pas discutée. Comme pour les premières études d'oxydation réalisées avec PerR, les concentrations en H_2O_2 utilisées *in vitro* sont relativement élevées (de l'ordre de 10 mM). Par analogie avec les résultats de J.D. Helmann, la formation d'un pont disulfure n'est probablement pas à l'origine de la levée de répression de FurS *in vivo*.

```

          96 99                                136139
Bha BH0951 -HYHVICEECGKIVDFHYP-GLDEVETLAEHVT---GFKVSSHRMEIY-GICPDCQKK-----SQH
Bce PerR   -HYHVICEKCGKIVDFPYG-GLEQLEEEAAKTT---GFVINSHRLEIY-GVCPECHKA
Ban BA0537 -HYHVICEKCGKIVDFPYG-GLEKLEEEAAKTT---GFVINSHRLEIY-GVCPECHKA
Lmo LMO1683 -HYHAICNVCGKIVDFHYP-GLDEVEHFAAHMT---GYEIDNHRLEVY-GICPCCKEQS-----NN
Lin LIN1791 -HYHAICNVCGKIVDFHYP-GLDEVEHFAAHMT---GYEIDNHRLEVY-GTCPECKEQS-----NN
Oih OB0905 -HYHIICNECGKIVDFHYP-SLNEVESLAEQVT---GFDVSHRLEVY-GKCDDCQAVNT-----KKH
Sau PerR   -HYHIICEQCGKIVDFQYP-QLNEIERLAQHMT---DFDVTHHRMEIY-GVCKECQDK
Sep SE1545 -HYHIICEKCGKIVDFHYP-QLDEVEQLAQHVT---DFDVTHHRMEIY-GVCKECKEEGN
Cje PerR   -HIHVVCTKCGGIEDLSFK--DAKLYEYQEHLEKKIGNLVNHLSVCAYVDNCKKCH
Spy PerR   -HVNVCEICGKIADFMDV-DVMDIAKEAHEQT---GYKVTRIPVIAIY-GICPDCQAKDQ-----PDF
Sav CatR   -HHHLVCARCGAIRDVH-PSGN-PLADLPDSER---FGFTVSDVEVTYR-GVCPCNCAAA
Sco CatR   -HHHLVCARCGAIRDVH-PTGN-PLADLPDSER---FGFTVSDVEVTYR-GTCPCNCAAA
Sco FurA   -HHHVLCRSCGALADVDCAVGDAPCLTASDDR---GFVIDEAEVIYR-GLCPDCSTPGS-----SPAP
Sre FurS   -HHHIVCRSCGAVADVDCAVGDAPCLTAADDH---GFAIDEAEVYIW-GLCPDCSTGRS-----S
Mma FurA   -HHHVVCRSCGAIADIDCPVGEAPCLAPSDDSNVLDGFVDEAEVIYIW-GICPDCSTAMP-----RSQP
Mtu FurA   -HHHIVCRSCGVIADVDCAVGEAPCLTASDHN---GFLLDEAEVIYIW-GLCPDCSISDTS-----RSHP
Mbo FurA   -HHHIVCRSCGVIADVDCAVGEAPCLTASDHN---GFLLDEAEVIYIW-GLCPDCSISDTS-----RSHP
Msm FurA   -HHHVVCRSCGDIADVDCAVGEAPCLTGSDHH---ATPSDEAEVIYIW-GTCPCCAQDPTVRKHELPRSH
          * : : *   ** : * .                :      . * *
Bs   PerR   -HYHAICENCGKIVDFHYP-GLDEVEQLAAHVT---GFKVSHRLEIY-GVCQECSKKEN-----H

```

Figure II.8 : alignement des séquences de protéines « PerR-like ». L'alignement s'étend des résidus His91 à His145 de PerR *B. subtilis*. Les astérisques indiquent les résidus conservés.

La mise en évidence chez PerR de *B. subtilis* d'un site à zinc $Zn(Cys)_4$ purement structural suggère que les résultats décrits pour FurS (et d'autres protéines « PerR-like » telles que CatR de *Streptomyces coelicolor* (Hahn *et al.*, 2000) sont à prendre avec précaution en attendant des résultats complémentaires.

Barbirz, S., Jakob, U. & Glocker, M. O. (2000). Mass spectrometry unravels disulfide bond formation as the mechanism that activates a molecular chaperone. *J Biol Chem* **275**: 18759-18766.

Barford, D. (2004). The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 679-686.

de Peredo, A. G., Saint-Pierre, C., Adrait, A., Jacquamet, L., Latour, J. M., Michaud-Soret, I. & Forest, E. (1999). Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from *Escherichia coli*: Chemical modification and mass spectrometry analysis. *Biochemistry* **38**: 8582-8589.

Graf, P. C. F., Martinez-Yamout, M., VanHaerents, S., Lilie, H., Dyson, H. J. & Jakob, U. (2004). Activation of the redox-regulated chaperone Hsp33 by domain unfolding. *J Biol Chem* **279**: 20529-20538.

Graumann, J., Lilie, H., Tang, X., Tucker, K. A., Hoffmann, J. H., Vijayalakshmi, J., Saper, M., Bardwell, J. C. & Jakob, U. (2001). Activation of the redox-regulated molecular chaperone Hsp33--a two-step mechanism. *Structure* **9**: 377-387.

Hahn, J. S., Oh, S. Y., Chater, K. F., Cho, Y. H. & Roe, J. H. (2000). H₂O₂-sensitive fur-like repressor CatR regulating the major catalase gene in *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* **275**: 38254-38260.

Herbig, A. F. & Helmann, J. D. (2001). Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* **41**: 849-859.

Ilbert, M., Graf, P. C. F. & Jakob, U. (2006). Zinc center as redox switch - New function for an old motif. *Antiox Red Signal* **8**: 835-846.

Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**: 395-418.

Imlay, J. A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* **59**: 1073-1082.

Jacob, C., Maret, W. & Vallee, B. L. (1998). Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3489-3494.

Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J. L., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. (1998). X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**: 2564-2571.

Jakob, U., Eser, M. & Bardwell, J. C. A. (2000). Redox switch of Hsp33 has a novel zinc-binding motif. *J Biol Chem* **275**: 38302-38310.

Jakob, U., Muse, W., Eser, M. & Bardwell, J. C. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96**: 341-352.

Kiley, P. J. & Storz, G. (2004). Exploiting thiol modifications. *PLoS Biol* **2**: 1714-1717.

Knapp, L. T. & Klann, E. (2000). Superoxide-induced stimulation of protein kinase C via thiol modification and modulation of zinc content. *J Biol Chem* **275**: 24136-24145.

Korichneva, I., Hoyos, B., Chua, R., Levi, E. & Hammerling, U. (2002). Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *J Biol Chem* **277**: 44327-44331.

Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G. & Ryu, S. E. (2004). Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1179-1185.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006a). The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* **440**: 363-367.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006b). Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J Biol Chem* **281**: 23567-23578.

Li, W., Bottrill, A. R., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Paget, M. S. B. & Kleanthous, C. (2003). The role of zinc in the disulphide stress-regulated anti-sigma factor RsrA from *Streptomyces coelicolor*. *J Mol Biol* **333**: 461-472.

Lucana, D. O. D. & Schrempf, H. (2000). The DNA-binding characteristics of the *Streptomyces reticuli* regulator FurS depend on the redox state of its cysteine residues. *Mol Gen Genet* **264**: 341-353.

Lucana, D. O. D., Troller, M. & Schrempf, H. (2003). Amino acid residues involved in reversible thiol formation and zinc ion binding in the *Streptomyces reticuli* redox regulator FurS. *Mol Genet Gen* **268**: 618-627.

Maret, W. & Vallee, B. L. (1998). Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3478-3482.

Paget, M. S. B. & Buttner, M. J. (2003). Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* **37**: 91-121.

Pohl, E., Holmes, R. K. & Hol, W. G. J. (1998). Motion of the DNA-binding domain with respect to the core of the diphtheria toxin repressor (DtxR) revealed in the crystal structures of apo- and holo-DtxR. *J Biol Chem* **273**: 22420-22427.

Pohl, E., Holmes, R. K. & Hol, W. G. J. (1999). Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *J Mol Biol* **285**: 1145-1156.

Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. & Vasil, M. L. (2003). Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**: 903-915.

Riddles, P. W., Blakeley, R. L. & Zerner, B. (1983). Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol* **91**: 49-60.

Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L. & Tacnet, F. (2004). Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* **29**: 351-357.

Winter, J., Linke, K., Jatzek, A. & Jakob, U. (2005). Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol Cell* **17**: 381-392.

Won, H. S., Low, L. Y., De Guzman, R., Martinez-Yamout, M., Jakob, U. & Dyson, H. J. (2004). The zinc-dependent redox switch domain of the chaperone Hsp33 has a novel fold. *J Mol Biol* **341**: 893-899.

Wu, X. S., Bishopric, N. H., Discher, D. J., Murphy, B. J. & Webster, K. A. (1996). Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change. *Mol Cell Biol* **16**: 1035-1046.

Chapitre III

Vers une forme active de la protéine.

Nous venons de le voir dans le chapitre précédent, la structure cristallographique de l'apoprotéine PerR-Zn a été résolue. Des expériences de retard sur gel réalisées au laboratoire ont montré que, sous cette forme, PerR n'est pas capable de se fixer à sa séquence de reconnaissance. La forme PerR-Zn n'est donc pas active. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui indiquent la nécessité du métal de régulation ($M = Fe^{2+}$ ou Mn^{2+}) pour lier l'ADN (Herbig & Helmann, 2001). Cette différence d'activité entre les formes apo (PerR-Zn) et métallée (PerR-Zn-M) de la protéine suggère que ces deux formes présentent deux conformations différentes. La fixation du métal de régulation entraînerait donc un réarrangement structural permettant à la protéine d'adopter la conformation nécessaire pour interagir de manière spécifique avec l'ADN.

Dans cette partie de notre travail, nous avons tenté d'évaluer les changements structuraux qui ont lieu lors de la métallation de la protéine. Dans cette optique, la spectroscopie de fluorescence a permis d'obtenir des résultats intéressants qui sont détaillés dans la suite de ce chapitre. En parallèle à ce travail, des essais de cristallisation de la forme active de PerR sont actuellement en cours au laboratoire en collaboration avec le groupe Synchrotron du LCCP (Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines- IBS Grenoble).

I. Un modèle pour la forme active.

1) Comparaison dans les banques de données structurales

A ce jour, la structure de la forme active de la protéine PerR, contenant le métal de régulation, n'a pas été résolue. Cependant, des essais de modélisation basés sur la structure de la forme PerR-Zn et celle de la protéine Fur de *Pseudomonas aeruginosa*, ont permis d'établir un modèle pour la forme active PerR-Zn-M ($M=Fe^{2+}$ ou Mn^{2+}). L'algorithme DALI (**D**istance matrix **A**lignment) a été utilisé pour réaliser des comparaisons structurales entre PerR-Zn et les structures disponibles dans la Protein Data Bank (PDB). La protéine Fur de *P. aeruginosa* a été déterminée comme le plus proche homologue structural de PerR.

2) Structure cristallographique de la protéine Fur de *P. aeruginosa*

Pohl *et al.* ont cristallisé la forme métallée en excès de Zn^{2+} de la protéine Fur de *P. aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003). La structure obtenue est un dimère de 2*134 résidus contenant une glycine et une sérine supplémentaires à l'extrémité N-terminale. La présence de ces résidus est due à la construction plasmidique utilisée. Pohl *et al.* ont construit une protéine de fusion avec la Glutathion S-transférase (GST, fusionnée en N-terminal de Fur). Après purification, la GST est clivée par la thrombine mais une glycine et une sérine supplémentaires restent présentes à l'issue de la protéolyse. Des cristaux ont été obtenus avec cette protéine et ont permis de résoudre sa structure. La protéine Fur de *P. aeruginosa* est constituée de deux domaines (Figure III.1) :

- un domaine C-terminal permettant la dimérisation (résidus 85 à 147). L'interface de dimérisation est constituée d'un long feuillet β antiparallèle (12 résidus) regroupant les brins B5/B5' et les hélices H5/H5'. Cette interface est stabilisée par l'interaction de résidus hydrophobes qui sont conservés dans les différents organismes au sein de B5 (motif LYLY) et H5 (I113).
- un domaine N-terminal (résidus 1 à 84) contenant le motif de liaison à l'ADN de type hélice-coude-hélice ailé. Ce motif contient notamment l'hélice H4 d'interaction avec l'ADN. La structure montre que les hélices H4 et H4' sont orientées de manière perpendiculaire permettant leur interaction avec l'ADN.

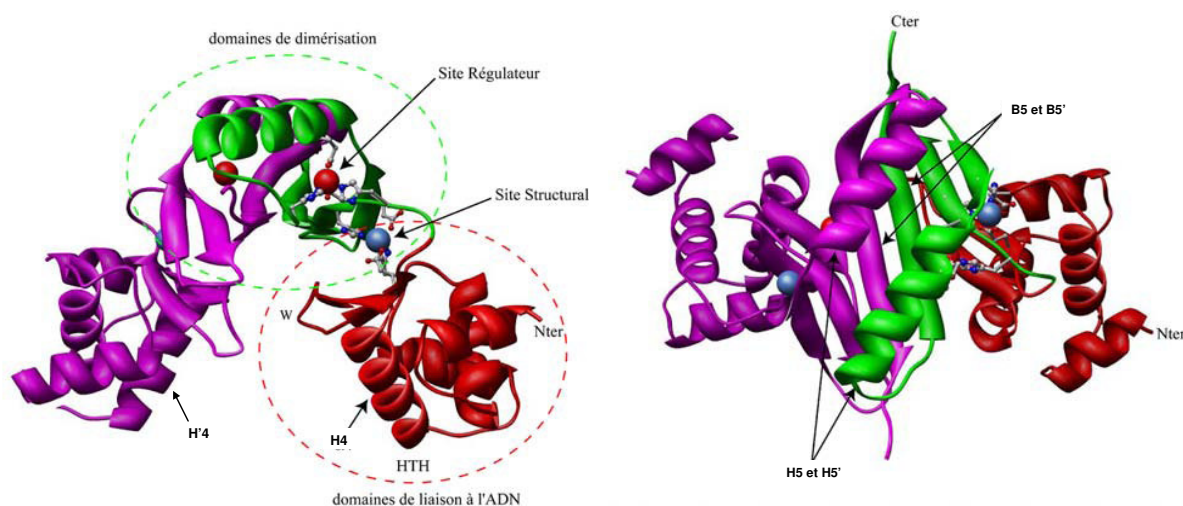


Figure III.1 : structure cristallographique du dimère Fur de *P. aeruginosa* ayant incorporé du zinc dans le site régulateur. Une sous-unité est représentée en magenta. Dans l'autre sous-unité, le domaine de liaison à l'ADN est représenté en rouge et le domaine de dimérisation en vert. Le zinc du « site structural » est représenté en bleu et celui du « site régulateur » en rouge.

Les sites métalliques de la protéine ont été identifiés par XAS (X-ray Absorption Spectroscopy) en dialysant la protéine purifiée contre du tampon contenant du Fe(II) (Figure III.2) (Pohl *et al.*, 2003). Cette technique a permis d'identifier la présence de Zn²⁺ et de Fe²⁺ dans l'échantillon. Comme le Zn²⁺ n'a pas été utilisé durant la purification, les auteurs en ont déduit qu'il existe un site à zinc déjà occupé dans la protéine. De plus, le zinc ne pouvant pas être échangé par du Fe²⁺ lors de la dialyse, les auteurs ont conclu qu'il s'agit d'un site de haute affinité pour le Zn²⁺. Les études spectroscopiques (XANES, X-ray Absorption Near-Edge Structure et EXAFS, Extended X-ray Absorption Fine Structure) ont montré que ce site à zinc est tétraédrique ce qui appuie l'identification de ce site comme le site structural. Les ligands proposés pour le zinc sont les résidus His32, Glu80, His89 et Glu100. Ces études ont également montré que le site contenant le Fe²⁺ contient 5 ou 6 ligands de type azote ou oxygène. Les auteurs en ont donc déduit qu'il s'agit du site régulateur. Dans ce cas, les ligands proposés pour le fer sont les résidus His86, Asp88 (ligand bidentate), Glu107, His124 ainsi qu'une molécule d'eau.

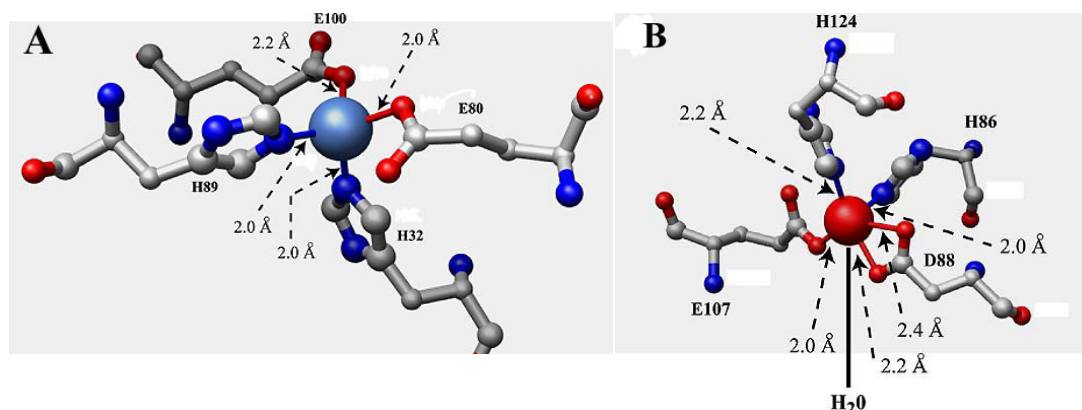


Figure III.2 : sites métalliques de Fur de *P. aeruginosa* d'après la structure cristallographique et les données XAS. A) Site structural B) Site régulateur.

Cependant, la nature de ces sites métalliques a récemment été remise en question. Les résidus proposés par E. Pohl comme étant les résidus du site de régulation de Fur de *P. aeruginosa* sont conservés chez Fur de *Bradyrhizobium japonicum*. Cette dernière a été mutée au niveau de ces résidus et les mutants correspondants sont toujours capables de lier le métal de régulation (Friedman & O'Brian, 2004). De plus, une étude récente a montré que les histidines 32 et 89 de Fur de *P. aeruginosa* sont essentielles pour la liaison du métal de régulation, *in vivo*, et donc pour l'activité de la protéine (Giedroc & Arunkumar, 2007) alors qu'elles ont été proposées comme ligands du zinc structural par le groupe de E. Pohl. Il

apparaît donc que ce groupe s'est trompé et que le site proposé comme étant le site structural corresponde en fait au site de régulation. Sa configuration tétraédrique serait très probablement induite par la liaison du zinc (qui a été ajouté en excès lors de la purification) alors que la liaison du fer entraînerait une géométrie différente mais indéterminée à ce jour (Giedroc & Arunkumar, 2007).

3) Hypothèse pour la forme active de PerR

Des comparaisons structurales effectuées avec les domaines N-terminal et C-terminal de PerR, pris séparément, ont montré que les plus proches homologues sont respectivement les domaines N-terminal et C-terminal de la protéine Fur de *P. aeruginosa*. A partir de cette observation, un modèle de la forme active de PerR a été réalisé en superposant les domaines N-terminal et C-terminal des deux protéines (Figure III.3).

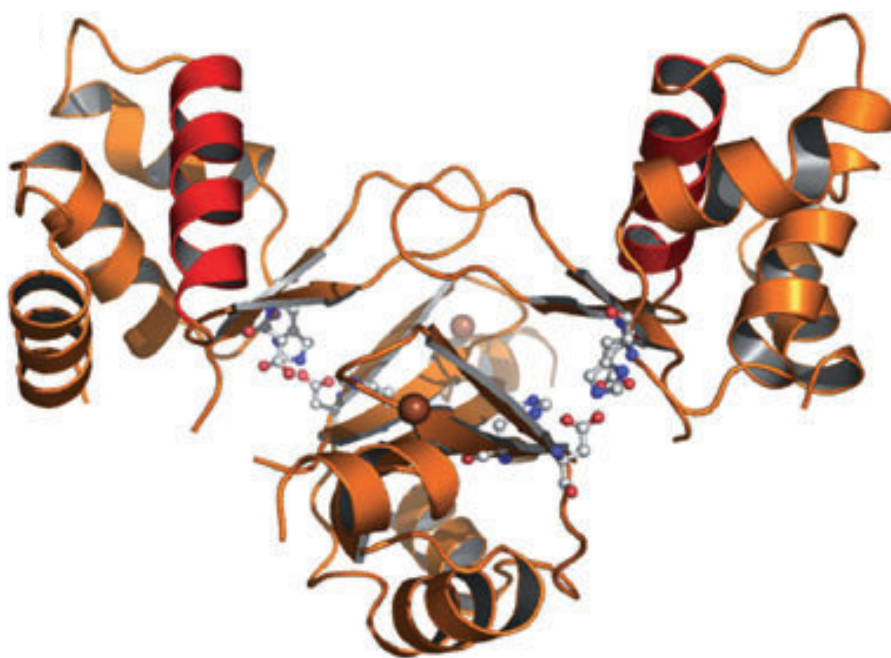


Figure III.3: représentation de la forme active du dimère de PerR avec les deux hélices H4 en rouge. Les atomes de zinc sont en marron. Les cinq résidus du site potentiel de régulation sont également indiqués.

Ce modèle de la forme active de PerR présente la protéine sous forme d'une « pince ». Il est obtenu en réalisant une rotation de 160° du domaine C-terminal par rapport au domaine N-terminal de la forme PerR-Zn. Logiquement dans cette configuration, l'homologie avec la

protéine Fur de *P. aeruginosa* est très forte. Les hélices H4 de chaque monomère de PerR sont alors positionnées de façon analogue à celles de la protéine Fur et donc idéalement placées pour interagir avec l'ADN.

4) Un site potentiel de régulation

Ce modèle permet, par ailleurs, de mettre en évidence un site potentiel de coordination pour le métal de régulation (Figure III.4). Il est composé de cinq acides aminés (His 37, 91, 93, et Asp 85, 104) conservés chez les membres de la famille de PerR (Figure III.5).

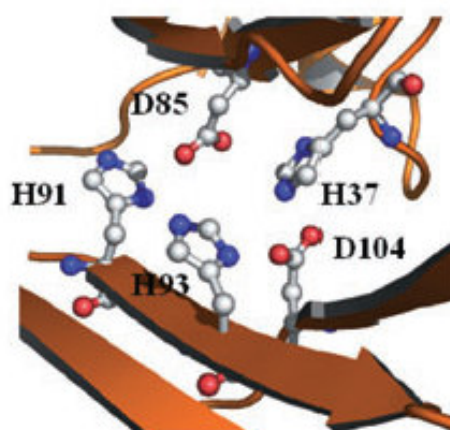


Figure III.4 : zoom du site potentiel de régulation mis en évidence par la rotation de 160° du domaine C-terminal par rapport au domaine N-terminal aboutissant à la forme active de PerR.

Sau PerR	-HT H PT----R F D -FNTHN H Y H IICEQCGKIV D FQYP-
Cje PerR	-HE H PN----CY D -IYEE H I H VVCTKCGGIE D LSFK-
Spy PerR	-TE H PS----YY D -FMGHQ H V N VVCEICGKIA D FMDV-
Sco CatR	-HV H LT----RY D PNHRP H H H LVCAIRCAIR D VH-P-
Sre FurS	-GD H LG----RY E GRVGDN H H H IVCRSCGAVADVDCA-
...	
Bsu PerR	-MA H PT----R F D -FVTSD H Y H AICENCGKIV D FHYP-

Figure III.5 : alignement des séquences des protéines PerR-like au niveau des ligands potentiels du métal de régulation (Sau *Streptococcus aureus* ; Cje *Campylobacter jejuni* ; Spy *Streptococcus pyogenes* ; Sco *Streptococcus coelicolor* ; Sre *Streptococcus reticuli* ; Bsu *Bacillus subtilis*).

Ce site est en accord avec les résultats récents du groupe de J.D. Helmann qui a montré par des expériences de mutagenèse dirigée que ces cinq acides aminés sont essentiels

pour l'activité de répresseur de PerR *in vivo* (Lee & Helmann, 2006a). Il est intéressant de noter que ce site potentiel de régulation est superposable au « site structural » proposé par E. Pohl pour Fur de *P. aeruginosa* avec notamment les histidines 37 et 91 de PerR qui correspondent aux histidines 32 et 89 de Fur. Comme nous l'avons mentionné précédemment, le groupe de E. Pohl s'est très probablement trompé dans l'attribution des sites métalliques. Le site structural proposé dans Fur de *P. aeruginosa* est en fait le site de régulation. Il est équivalent au site de régulation que nous proposons pour PerR. Il faut noter que, parmi les cinq ligands potentiels du métal de régulation, l'histidine 37 appartient au domaine N-terminal alors que les autres ligands appartiennent au domaine C-terminal. La fixation du métal pourrait donc induire une rotation des deux domaines N-terminal et C-terminal autour d'une boucle flexible (résidus F86 à H91) et permettrait ainsi de maintenir la protéine sous sa forme active PerR-Zn-M capable de lier l'ADN.

Comme nous venons de le voir, le modèle structural de la forme active PerR-Zn-M suggère qu'il y a un changement de conformation lors de la métallation de la protéine apo-PerR-Zn. Dans le but de valider cette hypothèse et de montrer que ce changement structural se produit en solution, nous avons analysé l'étape de métallation et la formation du complexe ADN-PerR par spectroscopie de fluorescence. Les résultats obtenus sont présentés dans le paragraphe suivant après une brève introduction sur la spectroscopie de fluorescence.

II. Démarche expérimentale.

1) Principe de la spectroscopie de fluorescence des protéines

La fluorescence est un phénomène physique qui résulte de l'émission de photons par une molécule appelée fluorophore à partir de l'énergie qu'elle a absorbée suite à son excitation par une radiation lumineuse dans l'ultraviolet et le visible. Le fluorophore en question est capable d'absorber l'énergie lumineuse d'une radiation dont le spectre énergétique présente un recouvrement avec le spectre d'absorption de la molécule. L'énergie absorbée est relibérée sous forme de lumière selon un spectre d'émission de plus faible énergie, soit des photons de longueur d'onde plus élevée, selon le diagramme de Jablonski présenté figure III.6.

La première étape du phénomène commence par l'excitation. Le fluorophore absorbe l'énergie provenant d'une source lumineuse et passe d'un état fondamental S_0 à un état excité S_1 . Cet état excité S_1 a une durée de vie très courte (de l'ordre de la nanoseconde). Les interactions avec les molécules environnantes font passer progressivement la molécule au niveau énergétique excité le plus faible S'_1 : c'est la conversion interne (CI). Le passage de l'état excité S'_1 à l'état fondamental S_0 se fait avec libération d'un photon d'énergie inférieure E_1 , donc de longueur d'onde supérieure à celle qui a été absorbée : c'est l'émission de fluorescence (Strasburg & Ludescher, 1995).

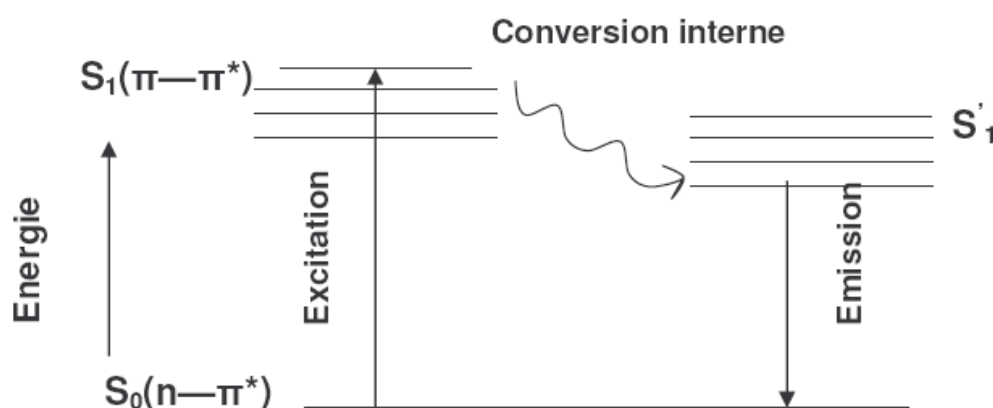


Figure III.6 : principe de l'émission de fluorescence (diagramme de Jablonski).

De nombreuses molécules sont capables d'absorber la lumière dans l'ultraviolet et dans le visible, mais peu parmi elles peuvent émettre la lumière absorbée sous forme de fluorescence. En effet, les fluorophores présentent des structures moléculaires particulières du type multiliaisons conjuguées ou noyaux aromatiques mono ou polycycliques, conférant à la molécule un squelette rigide (Strasburg & Ludescher, 1995). Les trois acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) sont responsables de la fluorescence intrinsèque des protéines. Les résidus tryptophane représentent 90% de la fluorescence des protéines du fait d'un rendement quantique élevé comparé aux deux autres acides aminés (Albani, 2001). Par son noyau indol, le tryptophane présente une émission de fluorescence dont les caractéristiques (longueur d'onde et intensité) peuvent être largement modulées par l'environnement de ce noyau. Dès lors, tout événement qui modifie l'exposition d'un tryptophane, tel qu'un changement de conformation ou la liaison d'un ligand, a pour effet de modifier sa fluorescence. La fluorescence intrinsèque constitue donc un outil de choix pour évaluer des changements de conformation d'une protéine, ou ses interactions avec différentes cibles. Il est important de noter que le maximum et l'intensité de fluorescence dépendent

fortement de la nature du milieu (polarité du milieu, pH, température) dans lequel le fluorophore est solubilisé. Les tryptophanes sont excités à 280 nm. Si on veut éviter l'excitation des tyrosines, on excite à 295 nm (longueur d'onde à laquelle les tyrosines n'absorbent presque plus). Le spectre d'émission des tryptophanes s'étend de 300 à 400 nm. Son maximum d'absorption passe de 350 nm, lorsqu'il est exposé au solvant (environnement polaire qui stabilise l'état excité), à 315 nm lorsqu'il est inséré au sein d'une protéine, généralement dans une poche hydrophobe (environnement apolaire) (Royer, 1995). C'est pourquoi la fluorescence permet d'apprécier également l'évolution du milieu environnant du fluorophore.

2) Exemple de la protéine OxyR

Les changements de conformation des protéines sont souvent à l'origine, *in vivo*, de la régulation de leur propre activité. Par exemple, comme nous l'avons détaillé dans l'introduction de ce manuscrit, la protéine OxyR d'*E. coli* change de conformation en réponse à un stress peroxydique. En effet, la protéine, inactive sous la forme réduite, réagit avec H₂O₂ entraînant la formation d'un pont disulfure entre les cystéines 199 et 208 qui étaient éloignées de 17 Å. La formation de ce pont disulfure intramoléculaire provoque un changement de conformation d'OxyR (forme oxydée active) ce qui modifie sa liaison à l'ADN. OxyR est alors capable de « recruter » l'ARN polymérase pour la transcription des gènes. Le changement de conformation d'OxyR entraîne une rotation relative des domaines de dimérisation de chaque monomère (Choi *et al.*, 2001) et c'est très probablement ce phénomène de rotation qui entraîne une modification de la liaison à l'ADN.

Les réarrangements structuraux d'OxyR ont récemment été étudiés grâce à la spectroscopie de fluorescence. L'émission de fluorescence d'OxyR (excitation à 280 nm) est due à un unique résidu tryptophane en position 175 (W175). A l'aide de différents mutants, les auteurs ont montré que, lorsque la protéine réagit avec H₂O₂, il y a formation du pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines C199 et C208 conduisant à une baisse de l'intensité de fluorescence de l'ordre de 20% ainsi qu'un décalage de la longueur d'onde maximale d'émission de 336 à 332 nm (Lee *et al.*, 2004). Le résidu W175 est situé au centre du domaine C-terminal d'OxyR, c'est-à-dire proche de la région où a lieu le changement de conformation. Le rapprochement des résidus histidine 198 (de 22 Å pour la forme réduite à 13 Å pour la forme oxydée), acide aspartique et de deux résidus acide glutamique présents dans

la région 210-215 expliquerait la baisse d'intensité de fluorescence du tryptophane après réaction avec H_2O_2 . En effet, ces trois résidus peuvent jouer le rôle de « quenchers » de fluorescence (Chen & Barkley, 1998). Grâce à la spectroscopie de fluorescence et la présence d'un unique résidu tryptophane au sein de la protéine, les auteurs ont réussi à démontrer un changement de conformation global de la protéine déclenché H_2O_2 .

3) Synthèse des mutants *PerR-Y44W* et *PerR-Y77W*

Par analogie avec les expériences réalisées sur OxyR, nous avons tenté de mettre en évidence les changements de conformation de la protéine PerR après métallation et fixation à l'ADN. Cependant, cette protéine ne contient pas de résidu tryptophane. A partir du modèle structural de la forme active de PerR, un résidu tryptophane en position 77 a été introduit à la place d'une tyrosine (mutant noté *PerR-Y77W*) par mutagenèse dirigée. Cette position a été choisie car lors du passage de la forme inactive à la forme active (c'est-à-dire de la forme *PerR-Zn* à la forme métallée *PerR-Zn-M*), l'environnement de ce résidu est très vraisemblablement modifié (Figure III.7). Ce changement de conformation doit alors entraîner une modification de l'émission de fluorescence du tryptophane.

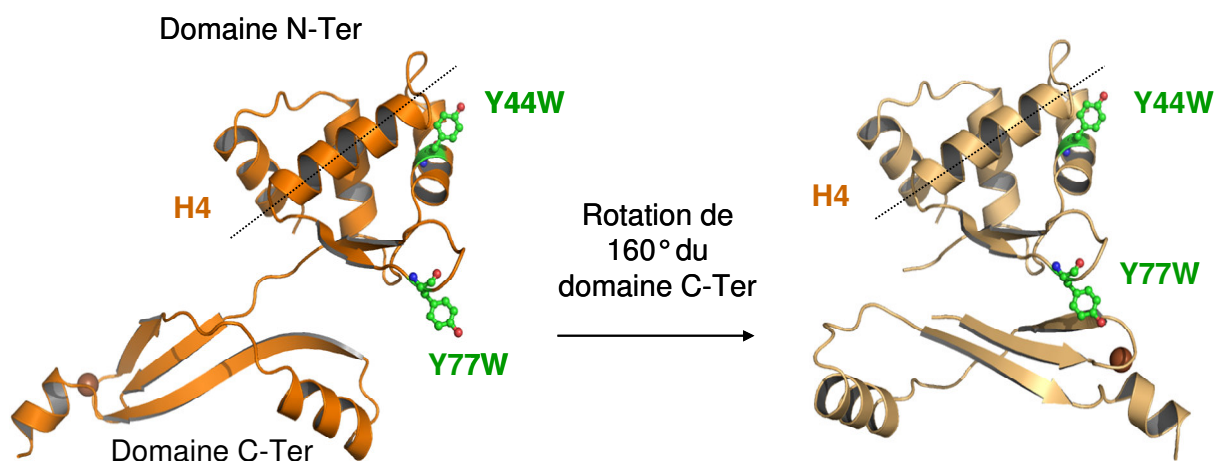


Figure III.7 : représentation du passage d'un monomère de PerR de la forme inactive à la forme active capable de lier l'ADN. Les résidus tryptophane 77 et 44 sont représentés.

Un autre mutant noté *PerR-Y44W* a également été synthétisé. Celui-ci correspond à l'introduction d'un résidu tryptophane à la place d'une tyrosine en position 44 (présent au sein de l'hélice H3). Ce résidu se trouve très proche de l'hélice H4, supposée interagir avec

l'ADN. Son environnement devrait donc être largement modifié lorsque la protéine se fixe sur l'ADN. Ces deux mutants devraient donc constituer de véritables sondes structurales permettant de mettre en évidence les changements de conformation de la protéine PerR en solution.

4) Vérification des structures secondaires et tertiaires des mutants

Afin de s'assurer que les mutants PerR-Y44W et PerR-Y77W peuvent être utilisés pour suivre les changements de conformation de la protéine lors de la métallation et de la fixation à l'ADN, nous avons vérifié que les mutations en position 44 et 77 n'entraînent pas de modifications des structures secondaires et tertiaires de la protéine PerR. Cette vérification a été réalisée grâce au dichroïsme circulaire (CD).

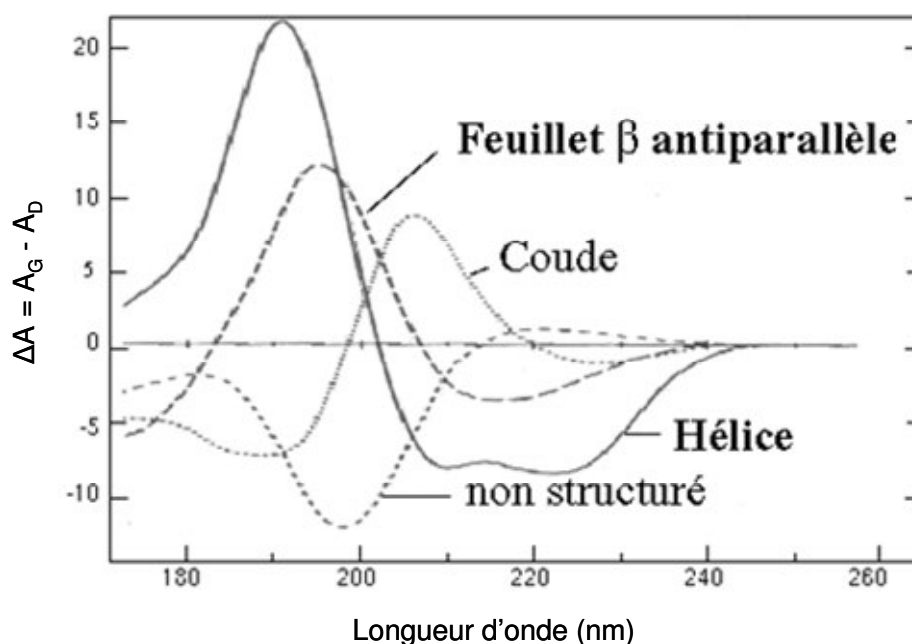


Figure III.8 : courbes caractéristiques CD suivant la nature de ces éléments de structure secondaire (Brahms & Brahms, 1980).

Toutes les molécules biologiques sont des chromophores, c'est à dire des molécules qui absorbent la lumière. Dans le cas où ces molécules sont chirales comme les protéines, elles peuvent donner naissance à un phénomène appelé dichroïsme circulaire qui consiste en l'absorption inégale des composantes circulaires droite et gauche de la lumière ($\Delta A = A_G - A_D$). Les mesures réalisées en UV lointain (195-250 nm) permettent de rendre compte des

structures secondaires de la protéine. La contribution de chacun des résidus à l'activité optique s'ajoute dans un arrangement régulier, et tend à se compenser dans des structures irrégulières. Les profils d'absorption d'une hélice α , d'un feuillet β et d'une « pelote statistique » (domaine non structuré) sont donnés en figure III.8. Les mesures réalisées en UV proche (250-320 nm) permettent de rendre compte de la structure tertiaire de la protéine.

Nous avons enregistré les spectres de CD dans l'UV lointain (195-250 nm ; Figure III.9A) et l'UV proche (250-320 nm ; Figure III.9B) de la protéine sauvage et des mutants PerR-Y44W et PerR-Y77W. Différents tampons ont été testés et la concentration en sels a notamment été diminuée afin d'éviter toute perturbation dans l'enregistrement des spectres : le tampon retenu est le tampon Tris/HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, DTT 1 mM.

Le spectre du dimère de PerR possède deux minima à 209 nm (-33 mdeg) et 222 nm (-38 mdeg) (Figure III.9A). Celui à 222 nm correspond aux transitions $n \rightarrow \pi^*$ que l'on retrouve dans les hélices α et celui à 209 nm correspond aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. Les spectres des mutants PerR-Y44W et PerR-Y77W présentent les mêmes minima que celui de la protéine sauvage. Les spectres sont quasi-superposables. Cette observation suggère que les structures secondaires n'ont pas été modifiées par les mutations ponctuelles. Cependant, à ces minima (209 et 222 nm), la valeur de l'ellipticité est plus élevée pour le mutant PerR-Y77W (-31 et -35 mdeg respectivement) et plus faible pour PerR-Y44W (-36 et -42 mdeg). Les différences observées s'expliquent très probablement par les légères différences de concentration entre les différents échantillons de protéines.

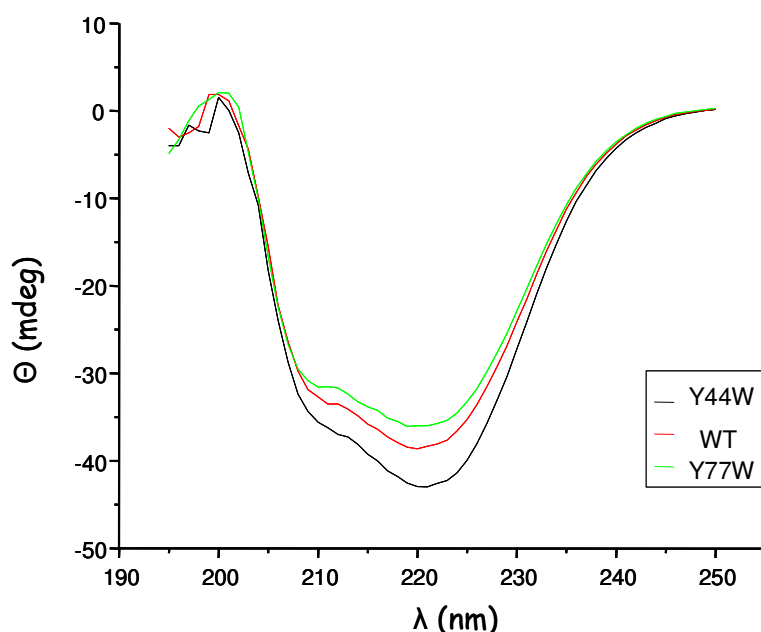


Figure III.9A : spectres de CD enregistrés dans l'UV lointain pour les deux mutants et la protéine sauvage.

Les spectres obtenus en UV proche pour les trois protéines sont également quasi-superposables. Ces spectres présentent un minimum à 275 nm et deux maxima à 256 et 291 nm. Les structures tertiaires des deux mutants sont donc également comparables à celle de la protéine sauvage.

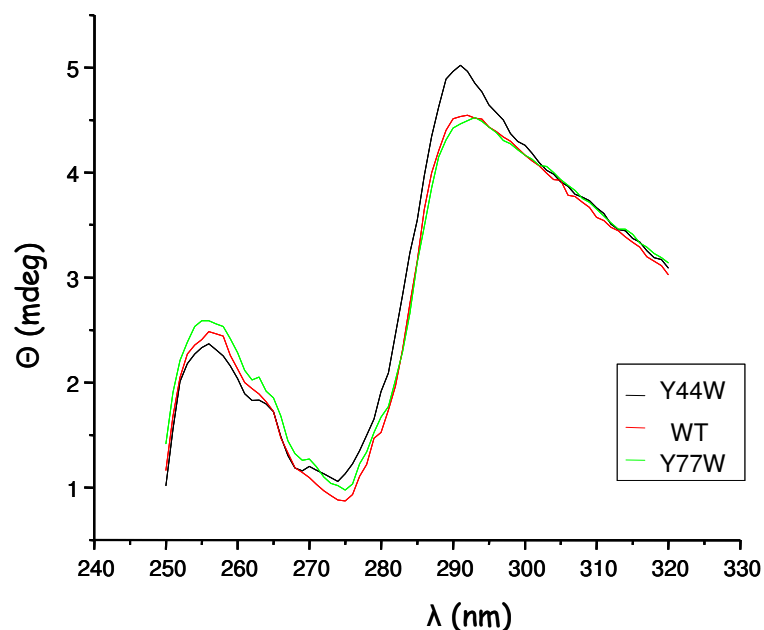


Figure III.9B : spectres de CD enregistrés dans l'UV proche pour les deux mutants et la protéine sauvage.

Toutes ces données indiquent que les mutants PerR-Y44W et PerR-Y77W synthétisés dans le but de suivre les modifications structurales de PerR possèdent une conformation identique à celle de la protéine sauvage. Le comportement de ces deux mutants lors de la métallation et de l'interaction avec l'ADN sera suivi par spectroscopie de fluorescence et les résultats obtenus pourront alors être extrapolés à la protéine sauvage.

III. Résultats.

Différents essais préliminaires ont permis de déterminer les conditions expérimentales optimales en termes de composition des tampons et de concentrations de la protéine et de l'ADN. Le tampon retenu pour ces études est le Tris/HCl 100 mM pH8, NaCl 250 mM. La concentration en protéine a été fixée à 500 nM pour les expériences de métallation (par une solution de $MnCl_2$) et à 100 nM pour les expériences de métallation en présence d'ADN ($[ADN] = 100$ nM). L'ADN utilisé est un duplex de 33 paires de bases contenant la séquence

de reconnaissance du promoteur du gène *mrgA*. La longueur d'onde d'excitation est de 295 nm et le spectre est enregistré pour des longueurs d'onde d'émission de 300 à 400 nm.

La fixation sur l'ADN des mutants PerR-Y44W et PerR-Y77W a préalablement été vérifiée par des expériences de retard sur gel. Leur fixation est similaire à celle de la protéine sauvage dont un gel d'électrophorèse est présenté au chapitre I.

1) Mutant PerR-Y44W

Les expériences de métallation réalisées avec le mutant PerR-Y44W, en absence d'ADN, ont montré que ni la longueur d'onde maximale d'émission ni l'intensité de fluorescence associée à cette longueur d'onde ne sont modifiées après ajout croissant d'une solution de Mn^{2+} (Figure III.10).

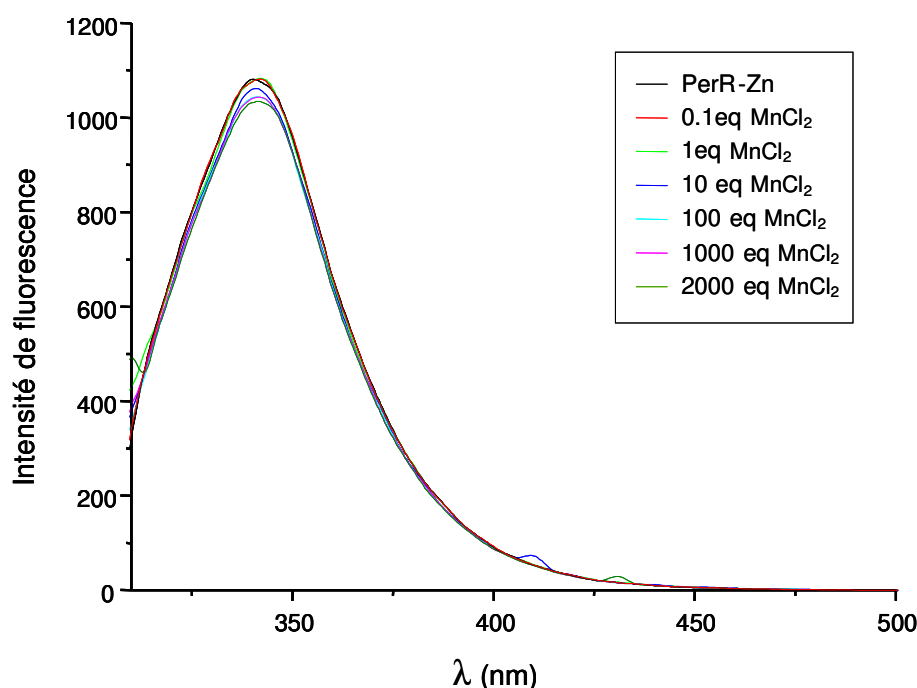


Figure III.10 : spectre de fluorescence du mutant PerR-Y44W après métallation par une solution de $MnCl_2$. La longueur d'onde maximale est égale à 340 nm.

L'environnement de la chaîne latérale du tryptophane en position 44 n'est donc pas modifié lorsque la protéine est métallée, c'est-à-dire lorsque celle-ci se trouve sous la forme active. La longueur d'onde maximale d'émission est égale à 340 nm ce qui correspond à celle d'un tryptophane exposé au tampon. L'ensemble de ces résultats va dans le sens du modèle de

la forme active présentée figure III.7. En effet, sous cette forme, l'environnement du résidu 44 semble ne pas être modifié après métallation et sa chaîne latérale apparaît totalement exposée au solvant. De manière surprenante, les expériences de métallation en présence d'ADN conduisent à des résultats identiques. L'intensité maximale de fluorescence ainsi que la longueur d'onde maximale d'émission du mutant PerR-Y44W ne sont pas modifiées (spectre de fluorescence non représenté). En se basant sur le modèle de la forme active et la proximité du tryptophane 44 avec le domaine de liaison à l'ADN (notamment l'hélice H4), on pouvait supposer que l'environnement de ce résidu serait modifié après liaison à l'ADN. Cependant, ces résultats suggèrent que l'environnement de la chaîne latérale du résidu 44 reste identique au sein du complexe ADN-protéine.

2) Mutant PerR-Y77W

Le mutant PerR-Y77W a donné des résultats plus exploitables. En effet, les expériences de métallation de cette protéine, en absence d'ADN cible, ont montré une baisse de l'intensité maximale de fluorescence en fonction de l'ajout de métal. Cette diminution est observée de 0,1 à 1000 équivalents en Mn^{2+} par rapport à la protéine, ce qui suggère une métallation progressive de la protéine (Figure III.11). Au-delà de 1000 équivalents en métal, l'intensité de fluorescence n'est plus modifiée ; la protéine est totalement métallée.

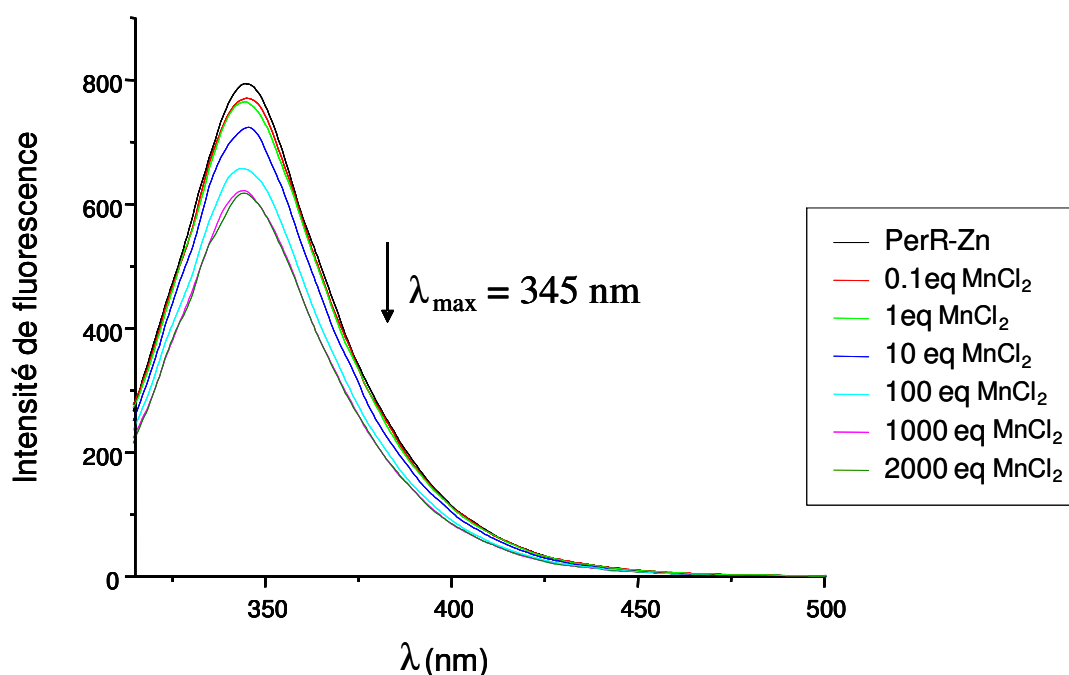


Figure III.11 : spectre de fluorescence du mutant PerR-Y77W après métallation par une solution de $MnCl_2$. La longueur d'onde maximale est égale à 345 nm.

La concentration en protéine PerR est égale à 500 nM. Cette valeur est la valeur maximale à laquelle ces expériences peuvent être réalisées. En effet, au-delà, l'émission de fluorescence est trop intense et on assiste à un phénomène de saturation. La constante de dissociation PerR/Mn²⁺ est de l'ordre de 2,8 µM (Lee & Helmann, 2006b). Cette valeur, qui est beaucoup plus élevée que la concentration en protéine utilisée, explique pourquoi il est nécessaire d'ajouter des concentrations en métal aussi élevées (d'après la figure III.11, 1000 équivalents en manganèse sont nécessaires) pour métaller totalement la protéine. L'expression du K_d de PerR pour le manganèse démontrée dans le chapitre I permet de représenter, pour une concentration donnée en protéine, la concentration en protéine métallée en fonction de la concentration ajoutée en manganèse. La figure III.12 présente la courbe obtenue pour une concentration en protéine de 500 nM. Cette représentation confirme que, pour avoir 100 % de protéine métallée (c'est-à-dire 500 nM), on doit ajouter une concentration de l'ordre de 1000 équivalents en manganèse (point d'intersection avec la courbe).

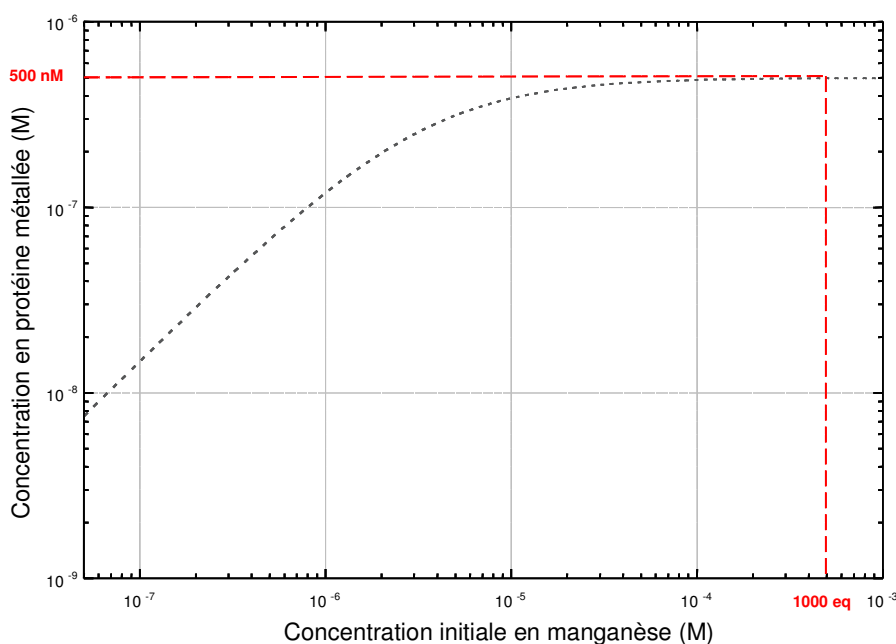


Figure III.12 : représentation de la concentration en protéine métallée en fonction de la concentration ajoutée en manganèse (échelles logarithmique). La concentration initiale en PerR est égale à 500 nM et le K_d à 2,8 µM.

La longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence, qui est égale à 345 nm, n'est pas modifiée après métallation. Cette valeur indique que le tryptophane est exposé au tampon et ne se trouve pas enfoui au sein de la protéine. La diminution de l'intensité de fluorescence du mutant PerR-Y77W indique une modification de l'environnement de la chaîne latérale du résidu 77 après métallation de la protéine. Cette modification est très

certainement liée à un changement structural de la protéine entraînant le rapprochement de résidus qui vont absorber l'émission de fluorescence du tryptophane 77. Ce résultat indique que la métallation de la forme PerR-Zn entraîne un changement de conformation de la protéine en solution. Ces données vont dans le sens du modèle structural de la forme active de PerR que nous avons proposé.

De manière inattendue avec le mutant PerR-Y77W, lorsque les expériences d'ajout de métal ont lieu en présence d'ADN, l'émission de fluorescence est également modifiée. Les concentrations en protéine et en ADN utilisées lors de ces expériences sont égales à 100 nM. La constante de dissociation (K_d) de la protéine PerR pour cette séquence d'ADN est de l'ordre de 15 nM (voir chapitres I et IV de la partie résultats). La constante de dissociation du complexe PerR-Y77W/ADN est égale à 13 ± 2 nM. A partir de ces données, on peut dire que lorsque la protéine est métallée par le manganèse ajouté, elle se fixe alors sur sa séquence de reconnaissance. Le phénomène observé est donc la variation de l'intensité de fluorescence du tryptophane suite à la fixation de la protéine sur l'ADN. Dans nos conditions expérimentales, l'intensité de l'émission de fluorescence de PerR-Y77W augmente après ajout du métal (Figure III.13). Cette augmentation est progressive de 0,1 à 1000 équivalents en Mn^{2+} .

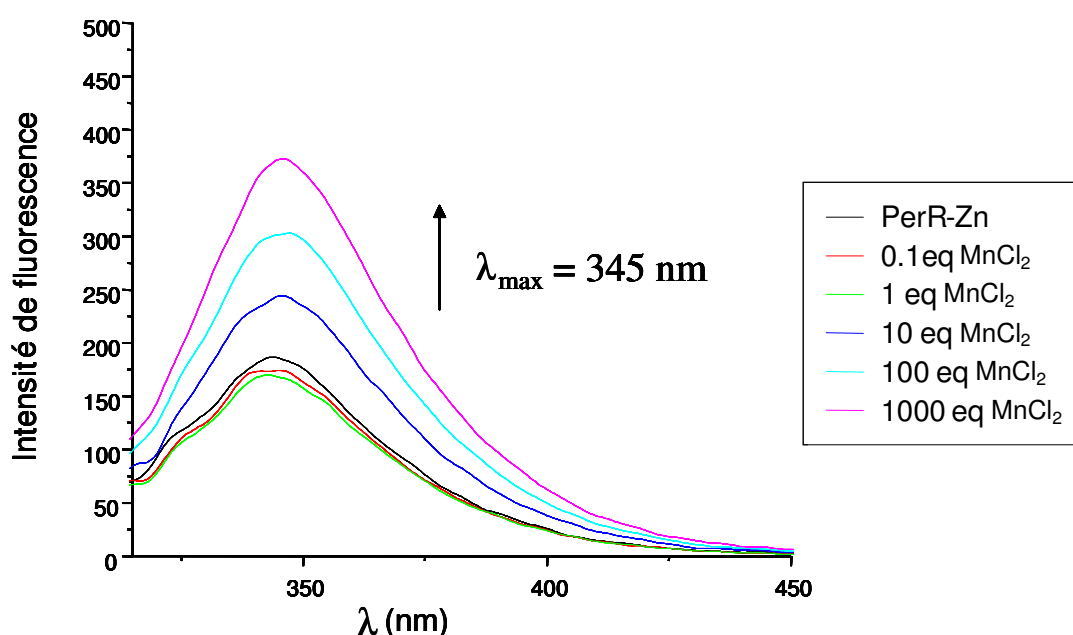


Figure III.13 : spectre de fluorescence du mutant PerR-Y77W, en présence d'ADN cible, après métallation par une solution de $MnCl_2$. La longueur d'onde maximale est égale à 345 nm.

La concentration en protéine utilisée lors de ces expériences est de 100 nM. Lorsqu'on trace, comme précédemment, la concentration en protéine métallée en fonction de la

concentration ajoutée en manganèse pour une concentration initiale de 100 nM en protéine, on constate que 1000 équivalents sont nécessaires pour avoir 100 % des protéines métallées et donc ici totalement fixées sur l'ADN.

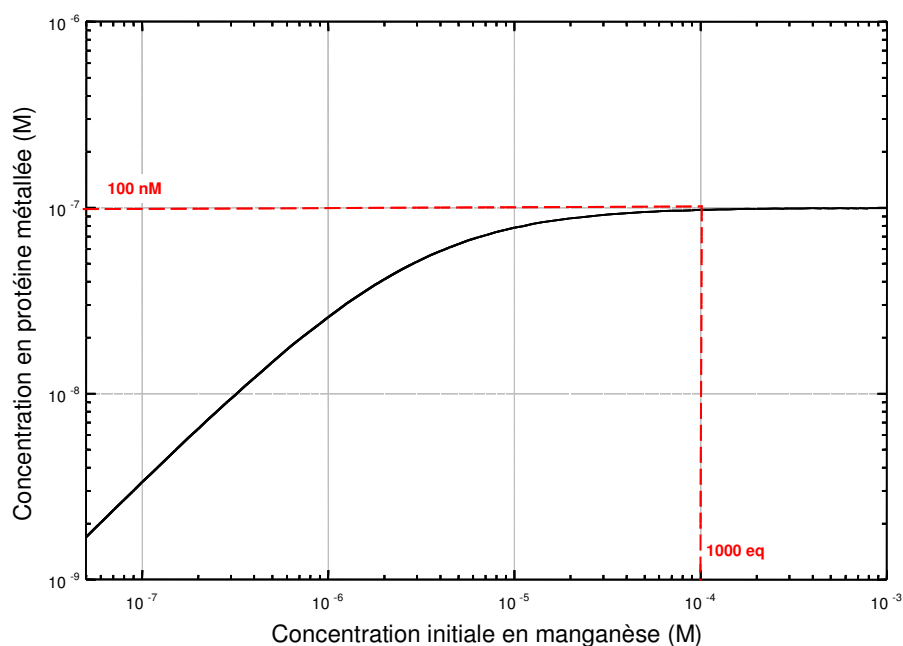


Figure III.14 : représentation de la concentration en protéine métallée en fonction de la concentration ajoutée en manganèse (échelles logarithmique). La concentration initiale en PerR est égale à 100 nM et le K_d à 2,8 μ M.

L'augmentation de l'intensité de fluorescence du mutant PerR-Y77W indique que l'environnement du résidu 77 est modifié lorsque la protéine se fixe sur l'ADN. Les changements structuraux impliqués dans la formation du complexe ADN-protéine sont différents de ceux observés lors de la métallation de la protéine en absence d'ADN. En effet, la métallation de PerR en absence d'ADN entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence de PerR-Y77W. Dans les deux cas, la longueur d'onde maximale d'émission reste inchangée à 345 nm. La chaîne latérale du tryptophane 77 reste donc largement exposée au solvant. On peut penser que l'augmentation de l'émission de fluorescence de la protéine est la conséquence de l'éloignement de certains acides aminés par rapport au résidu 77 lorsque la protéine est liée à l'ADN.

IV. Conclusion et discussion.

A partir de la structure cristallographique de la protéine apo-PerR-Zn (forme inactive), nous avons proposé un modèle de la forme active. Dans ce modèle, après un réarrangement structural, la protéine adopte une conformation en forme de « pince » capable d'interagir avec l'ADN grâce à ses deux hélices H4. La fixation du métal régulateur permet d'obtenir et de stabiliser cette conformation. Afin de valider ce modèle, l'étude des changements structuraux de la protéine en solution, lors de la métallation en absence ou en présence d'ADN, a été entreprise grâce à la spectroscopie de fluorescence. Dans ce but, des résidus tryptophane ont été introduits, par mutagénèse dirigée, au sein de la protéine PerR pour jouer le rôle de sondes structurales. La protéine PerR ne contenant pas d'autres résidus tryptophane, toute modification dans le spectre d'émission de fluorescence reflète un changement dans l'environnement du tryptophane.

Deux mutants de la protéine ont été synthétisés : PerR-Y44W et PerR-Y77W. Chacun contient un unique résidu tryptophane dont l'environnement est susceptible d'être modifié lors de la métallation de la protéine et de la formation du complexe ADN-protéine. Les expériences réalisées avec le mutant PerR-Y44W ont montré que celui-ci ne permet pas de suivre la métallation de la protéine et la formation du complexe ADN-PerR. Par contre, la métallation du mutant PerR-Y77W entraîne une baisse de l'intensité de fluorescence. Ce résidu W77, qui se trouve au sein d'une boucle flexible de la protéine, voit donc son environnement modifié lors du passage de la forme inactive à la forme active de PerR. Ce résultat, cohérent avec nos hypothèses structurales, va donc dans le sens d'un réarrangement conformationnel de la protéine en solution. Dans la forme métallée de PerR, ce tryptophane se trouve alors plus proche des résidus des feuillets β du domaine de dimérisation de la protéine. Ces résidus sont probablement responsables de la diminution de l'intensité de fluorescence en absorbant une partie de l'énergie émise par le tryptophane suite à son excitation. Cependant, la technique utilisée ne permet pas de déterminer avec précision quels sont les acides aminés responsables de cette diminution d'intensité. Le comportement de PerR-Y77W, en présence d'ADN, est également intéressant. En effet, nos expériences ont montré une augmentation de l'intensité de fluorescence après l'ajout de métal. Comme nous l'avons mentionné précédemment, cette augmentation est due à la fixation de la protéine sur l'ADN. Lors de la formation du complexe ADN-protéine, l'environnement du résidu W77 est également perturbé. L'augmentation de la fluorescence indique que certains acides aminés qui absorbaient une partie de l'émission de fluorescence se sont éloignés. Cependant, ce résultat

reste qualitatif et il est difficile d'en tirer des informations plus précises au niveau moléculaire. Comme nous l'avons prévu, le mutant PerR-Y77W constitue une sonde structurale permettant de suivre le changement de conformation de la protéine suite à sa métallation. Il permet aussi, de manière inattendue, d'affirmer que la conformation de la protéine est également modifiée lorsque celle-ci se fixe à l'ADN. L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine PerR existe, *in vitro*, sous trois formes en solution : la forme apo PerR-Zn, la forme métallée « libre » PerR-Zn-M et la forme métallée complexée à l'ADN.

La spectroscopie de fluorescence nous a donc permis de mettre en évidence les changements de conformation de la protéine en solution. Ce résultat va dans le sens du modèle structural proposé pour la forme active de PerR. La protéine adopte ainsi une conformation en « pince » permettant son interaction avec sa séquence de reconnaissance.

En perspective à ce travail, le mutant PerR-Y77W pourra être utilisé pour suivre le comportement de la protéine liée à l'ADN après réaction avec H₂O₂. En effet, *in vivo*, dans les conditions normales, PerR est liée à l'ADN au niveau de sa séquence cible. Lorsqu'elle réagit avec H₂O₂, la protéine se décroche très probablement suite à l'oxydation d'un ou plusieurs résidus du site actif et à la perte du métal de régulation. La dissociation du métal de régulation provoque alors un changement de conformation qui abolit les contacts entre les nucléotides et les acides aminés. La dissociation du complexe PerR-ADN entraînera une modification de l'environnement du tryptophane 77 et donc une modification de son émission de fluorescence. A ce jour, les données cinétiques de la dissociation du complexe ADN-PerR en présence d'H₂O₂ n'ont pas été déterminées. De manière analogue à la protéine OxyR, ces données pourraient être obtenues en utilisant les propriétés d'un résidu tryptophane en spectroscopie de fluorescence. En effet, à partir de la variation de l'intensité de fluorescence du résidu W175 d'OxyR, Lee *et al.* sont parvenus à déterminer une constante de vitesse égale à 4,9 s⁻¹ qui correspond au réarrangement structural de la protéine provoqué par la formation du pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines C199 et C208 en présence d'H₂O₂ (Lee *et al.*, 2004).

Dans le cas de PerR, il serait intéressant de déterminer la cinétique de décrochage de l'ADN liée à l'oxydation de la protéine au niveau de son site de régulation. Dans ce cas, les expériences de réactivité du PerR-Y77W avec H₂O₂ seront réalisées avec la forme PerR-Y77W-Zn-Fe en conditions strictes d'anaérobiose.

Albani, J. R. (2001). Effect of binding of Calcofluor White on the carbohydrate residues of alpha(1)-acid glycoprotein (orosomucoid) on the structure and dynamics of the protein moiety. A fluorescence study. *Carbohydr Res* **334**: 141-151.

Brahms, S. & Brahms, J. (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol* **138**: 149-178.

Chen, Y. & Barkley, M. D. (1998). Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* **37**: 9976-9982.

Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G. & Ryu, S. (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105**: 103-113.

Coy, M., Doyle, C., Besser, J. & Neilands, J. B. (1994). Site-directed mutagenesis of the ferric uptake regulation gene of *Escherichia coli*. *Biometals* **7**: 292-298.

Friedman, Y. E. & O'Brian, M. R. (2004). The ferric uptake regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum* is an iron-responsive transcriptional repressor *in vitro*. *J Biol Chem* **279**: 32100-32105.

Giedroc, D. P. & Arunkumar, A. I. (2007). Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches. *Dalton Trans* **29**: 3107-3120.

Herbig, A. F. & Helmann, J. D. (2001). Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* **41**: 849-859.

Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G. & Ryu, S. E. (2004). Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1179-1185.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006a). The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* **440**: 363-367.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006b). Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J Biol Chem* **281**: 23567-23578.

Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. & Vasil, M. L. (2003). Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**: 903-915.

Royer, C. A. (1995). Fluorescence spectroscopy. *Methods Mol Biol* **40**: 65-89.

Strasburg, G. M. & Ludescher, R. D. (1995). Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research. *Trends Food Sci Tech* **6**: 69-75.

Chapitre IV

Interactions ADN-PerR.

Dans le chapitre II des résultats, nous avons montré que la structure cristallographique de la protéine apo-PerR-Zn permettait de mettre en évidence un motif hélice-coude-hélice (H3-T-H4) présent au niveau du domaine N-terminal. Ce motif HTH est impliqué dans la reconnaissance de l'ADN chez de nombreux régulateurs procaryotes (Brennan, 1992). Il est composé classiquement de deux hélices perpendiculaires, reliées entre elles par un « coude » de trois acides aminés possédant une conformation bien particulière. La première hélice permet de stabiliser le motif grâce à des interactions hydrophobes avec l'hélice qui interagit avec l'ADN. La seconde hélice du motif HTH est l'hélice de reconnaissance qui pénètre dans le grand sillon de l'ADN. Parmi les premiers exemples étudiés, on peut citer la protéine Cro du bactériophage lambda (Anderson *et al.*, 1981) et la protéine CAP d'*E. Coli* (McKay & Steitz, 1981).

La zone d'interaction potentielle de PerR avec l'ADN se situe sur l'hélice H4 : elle va de la sérine 55 à la sérine 69. Cette hélice a été identifiée grâce à des superpositions de structures du domaine N-terminal de PerR avec celui d'autres métallorégulateurs interagissant avec l'ADN (Figure IV.1) telles que Fur de *Pseudomonas aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003), DtxR de *Corynebacterium diphtheriae* (Pohl *et al.*, 1998) et IdeR de *Mycobacterium tuberculosis* (Pohl *et al.*, 1999). Il est intéressant de noter ici que seules les protéines Fur et PerR possèdent une hélice supplémentaire à l'extrémité N-terminale notée H1. Son importance dans la reconnaissance de l'ADN reste indéterminée à ce jour.

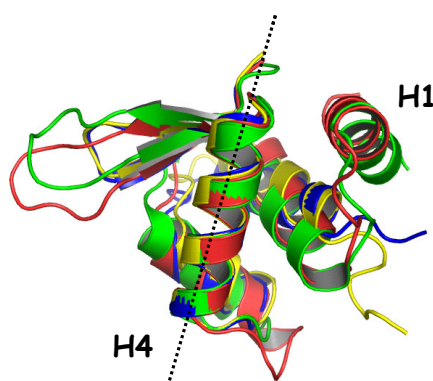


Figure IV.1 : superposition des structures des protéines Fur *P. aeruginosa* (vert), DtxR *C. diphtheriae* (bleu), IdeR *M. tuberculosis* (jaune) et PerR *B. subtilis* (rouge).

Les données de la littérature, basées sur des expériences d'empreinte sur gel, indiquent que PerR reconnaît une séquence d'ADN palindromique de 15 paires de bases (pb) en motif 7-1-7 dont seule la base centrale est peu conservée (Figure IV.2). Les résultats du groupe de J.D. Helmann (Fuangthong & Helmann, 2003), sur le promoteur du gène *mrgA*, montrent que

PerR présente une forte affinité pour sa séquence de reconnaissance (K_d d'environ 1 nM). Il est intéressant de noter que *Bacillus subtilis* possède trois protéines de la même famille : les protéines PerR, Fur et Zur. Les séquences d'ADN reconnues par ces trois protéines sont très proches et ne diffèrent que par une ou deux paires de bases (Figure IV.2). Les auteurs indiquent pourtant que chaque protéine fixe exclusivement sa séquence et qu'il n'y a pas de co-régulation ni *in vitro* ni *in vivo*.

Boîte PerR :	TTATAAT N ATTATAA
Boîte Fur :	TGATAAT N ATTATCA
Boîte Zur :	TCGTAAT N ATTACGA

Figure IV.2 : séquences consensus d'ADN reconnues par les protéines PerR, Fur et Zur chez *Bacillus subtilis* (N correspond à une base quelconque ; le brin complémentaire n'est pas noté).

A ce jour, aucune de ces trois protéines n'a été cristallisée avec l'ADN. Parmi les protéines qui ont permis d'identifier l'hélice H4 de PerR, seules IdeR et DtxR ont été cristallisées sous forme de complexe avec l'ADN (Wisedchaisri *et al.*, 2004 ; White *et al.*, 1998). Nous avons montré dans le chapitre précédent que la fixation du métal de régulation par PerR conduit très probablement à un repliement de la protéine, ce qui permet le passage de la forme apo à la forme active. Ce repliement induirait un repositionnement des hélices H4 de PerR qui peuvent alors interagir avec l'ADN de manière spécifique. Le peu d'informations sur les bases moléculaires de cette spécificité de reconnaissance de PerR nous a conduits à étudier son mode d'interaction avec l'ADN. Les résultats obtenus sont présentés dans ce chapitre.

Afin de déterminer les acides aminés impliqués dans la reconnaissance de l'ADN (oligonucléotide contenant la séquence consensus de reconnaissance), deux stratégies ont été envisagées. La première consiste à réaliser un adduit covalent ADN-PerR qui est ensuite analysé sur gel d'électrophorèse et par spectrométrie de masse. L'insertion de bases modifiées « activables » au sein de la séquence de reconnaissance de PerR peut permettre de réaliser un tel adduit. Les positions de ces bases modifiées ont été choisies sur la base des résultats du groupe de J.D. Helmann qui soulignent l'importance des positions 3, 5 et 12 dans la formation du complexe ADN-PerR (Fuangthong & Helmann, 2003). Cette première approche a été réalisée avec succès dans le cas de Fur d'*E. coli* (Tiss *et al.*, 2005). Les résultats de cette étude seront discutés à la lumière de nos données expérimentales. La seconde démarche est basée

sur des expériences de mutagenèse dirigée sur la protéine en exploitant le modèle structural de la forme active de PerR pouvant lier l'ADN présenté dans le chapitre précédent.

I. Réalisation d'un adduit covalent ADN-PerR.

1) Principe

Les adduits covalents ADN-protéine sont en général réalisés en utilisant des oligonucléotides contenant des bases modifiées de l'ADN. Ces bases peuvent être « activées » par un processus chimique (méthode basée sur les potentiels d'oxydoréduction de certaines bases modifiées de l'ADN) ou photochimique (rayonnement ultra-violet). Quel que soit le processus d'activation de l'ADN, il se produit un radical sur la base modifiée qui peut ensuite être piégé par attaque nucléophile d'un acide aminé de la protéine se trouvant à proximité. Cet acide aminé se situe donc à l'interface du complexe ADN-protéine. En ce qui concerne l'activation de l'ADN par voie chimique, les bases modifiées les plus couramment utilisées sont la 8-oxo-guanine et la 8-oxo-adénine (Figure IV.3).

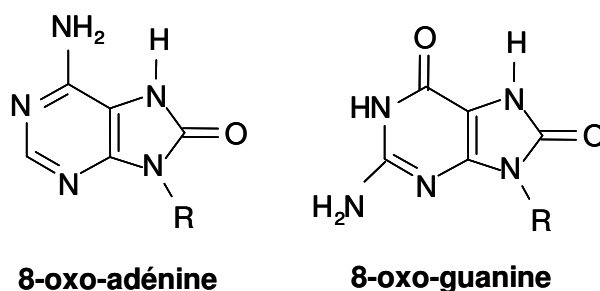


Figure IV.3 : structure de bases modifiées de l'ADN utilisées dans les réactions de pontage par voie chimique.

Les dérivés « 8-oxo » de la guanine et de l'adénine ont des potentiels d'oxydo-réduction plus bas que ceux des bases normales, ce qui permet de les oxyder sélectivement. Une telle approche, conduisant à un pontage covalent ADN-protéine, a récemment été décrite en utilisant un oxydant à un électron tel qu'un sel d'iridium (Na_2IrCl_6) (Hickerson *et al.*, 1999; Johansen *et al.*, 2005). Le sel Na_2IrCl_6 avec un potentiel redox de 0,9 V/ENH peut facilement activer la 8-oxo-guanine (0,7 V/ENH) et dans une moindre mesure la 8-oxo-

adénine (0,9 V/ENH). Il entraîne une déficience électronique sur la base modifiée qui peut alors subir une attaque nucléophile (Figure IV.4). Le nucléophile peut être un acide aminé de la protéine ayant des hétéroatomes suffisamment proches de la base modifiée pour pouvoir réagir avec cette dernière. L'adduit covalent ADN-Protéine ainsi obtenu est analysable, après digestion enzymatique et purification, par spectrométrie de masse (MALDI ou électrospray). Cette analyse permettra de déterminer les acides aminés les plus proches d'une des bases modifiées et donc de définir leur rôle dans la reconnaissance de l'ADN.

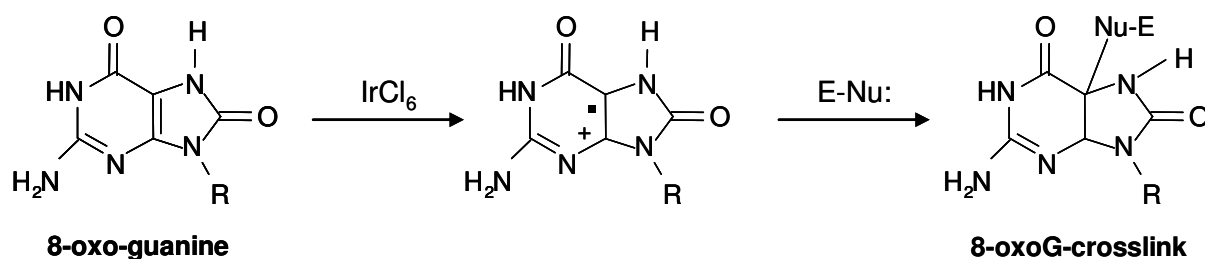


Figure IV.4 : principe de la formation de l'adduit covalent ADN-Protéine (Hickerson *et al.*, 1999).

Afin d'obtenir un adduit covalent ADN-protéine, l'activation chimique d'un oligonucléotide a été retenue. La séquence consensus reconnue par PerR ne contient pas de guanine. La substitution d'une adénine par une 8-oxoadénine a donc été privilégiée. Trois séquences de reconnaissance de la protéine PerR ont été synthétisées en insérant des 8-oxoadénines aux positions 3, 5 et 12 (notés OA_3 , OA_5 , OA_{12} sur la figure IV.5). Un oligonucléotide contenant une 8-oxoguanine en position 2 (noté OG_2 sur la figure IV.5) a également été synthétisé dans le but de comparer sa réactivité à celle des oligonucléotides OA_3 , OA_5 , OA_{12} . Dans tous les cas, les oligonucléotides, modifiés ou non, sont hybridés avec leur séquence complémentaire puis incubés sous forme de duplex avec la protéine dans différentes conditions.

Dans un premier temps, il faut s'assurer que l'interaction de la protéine avec ces séquences modifiées est comparable à celle observée avec la séquence de reconnaissance « native ». En d'autres termes, nous avons vérifié que les bases modifiées introduites dans la séquence de reconnaissance de PerR ne modifient pas significativement l'affinité de la protéine pour l'ADN. La technique de retard sur gel permet de déterminer les constantes de dissociation (K_d) du complexe ADN-protéine. Seules les séquences modifiées conduisant à

une constante de dissociation comparable à celle obtenue avec l'oligonucléotide natif seront retenues et utilisées dans la réaction de pontage chimique.

OA₃	5' GGG/CTAAA TT OA ₃ TAATNATTATAA TTTAGTA/GGG 3'
OA₅	5' GGG/CTAAA TTAT OA ₅ ATNATTATAA TTTAGTA/GGG 3'
OG₂	5' GGG/CTAAA TOG₂ ATAATNATTATAA TTTAGTA/GGG 3'
OA₁₂	5' GGG/CTAAA TTTTAATNATT OA ₁₂ TAA TTTAGTA/GGG 3'
Comp	3' CCC/GATTT AAAATTANTAATATT AAATCAT/CCC 5'

Figure IV.5. : séquences de reconnaissance modifiées de la protéine PerR. Les bases en gras correspondent à la séquence consensus de fixation de PerR, les bases en rouge à la position d'insertion de la 8-oxoadénine ou de la 8-oxoguanine. La séquence complémentaire (comp) est commerciale (Sigma-Aldrich). Les paires de bases GC à chacune des extrémités servent à stabiliser le duplex et évitent la formation de structure « hairpin ».

2) Affinité de PerR pour les différentes séquences oligonucléotidiques

Les expériences de retard sur gel ont été effectuées après marquage radioactif de l'oligonucléotide ([ADN] = 0,2 nM). La figure IV.6, réalisée avec la séquence d'ADN non modifiée, présente la formation du complexe ADN-PerR en fonction de la concentration en protéine (ligne 2-7). Une bande retardée sur gel commence à apparaître pour une concentration en protéine de 5 nM. Cette bande correspond à la formation du complexe ADN-PerR. L'ADN est totalement complexé au dessus d'une concentration de 20 nM en protéine. A partir de cette expérience, qui a été reproduite plusieurs fois, le pourcentage de complexe ADN-PerR formé est déterminé et porté sur un graphe en fonction de la concentration de PerR. La valeur de la constante de dissociation est alors calculée en utilisant l'équation suivante:

$$y = 250 \left((0.2 + x + K_d) - \sqrt{(0.2 + x + K_d)^2 - 0.8x} \right)$$

x est la concentration en protéine. [ADN] = 0,2 nM.

Cette équation a été obtenue en considérant la formation d'un adduit 1/1 entre PerR et l'ADN.



Les lois de conservation de la matière conduisent à:

$$(1) \quad [ADN]_0 = [ADN] + [Adduit] \quad (2) \quad [PerR]_0 = [PerR] + [Adduit]$$

De l'expression de la constante de dissociation, on tire :

$$[Adduit] = \frac{[PerR][ADN]}{K_d}$$

Reporté dans (2), cela donne :

$$[PerR]_0 = [PerR] \left\{ 1 + \frac{[ADN]}{K_d} \right\} \quad \text{soit} \quad [PerR] = \frac{K_d}{K_d + [ADN]} [PerR]_0$$

Si l'on reporte cette expression de la concentration en protéine libre dans l'expression de la concentration en adduit, on obtient alors:

$$[Adduit] = \frac{[ADN]}{K_d + [ADN]} [PerR]_0 \quad \text{soit} \quad [ADN] = K_d \frac{[Adduit]}{[PerR]_0 - [Adduit]}$$

On utilise maintenant l'équation (1) :

$$[ADN]_0 = [Adduit] \left\{ 1 + \frac{K_d}{[PerR]_0 - [Adduit]} \right\}$$

Il s'agit là d'une équation du second degré en $[Adduit]$:

$$[Adduit]^2 - \{[ADN]_0 + [PerR]_0 + K_d\} [Adduit] + [ADN]_0 [PerR]_0 = 0$$

La solution vaut précisément :

$$[Adduit] = \frac{1}{2} \left\{ ([ADN]_0 + [PerR]_0 + K_d) + \sqrt{([ADN]_0 + [PerR]_0 + K_d)^2 - 4 [ADN]_0 [PerR]_0} \right\}$$

Dans nos expériences, les variations de la concentration en adduit sont exprimées en pourcentage :

$$y = \frac{[Adduit]}{[ADN]_0} \times 100$$

Comme la concentration en ADN est égale à 0,2 nM, on obtient alors l'équation :

$$y = 250 \left((0.2 + x + K_d) - \sqrt{(0.2 + x + K_d)^2 - 0.8x} \right)$$

La figure IV.7 montre le graphe obtenu à partir de cette équation. Ce graphe permet de déterminer la constante de dissociation du complexe PerR-ADN non modifié.

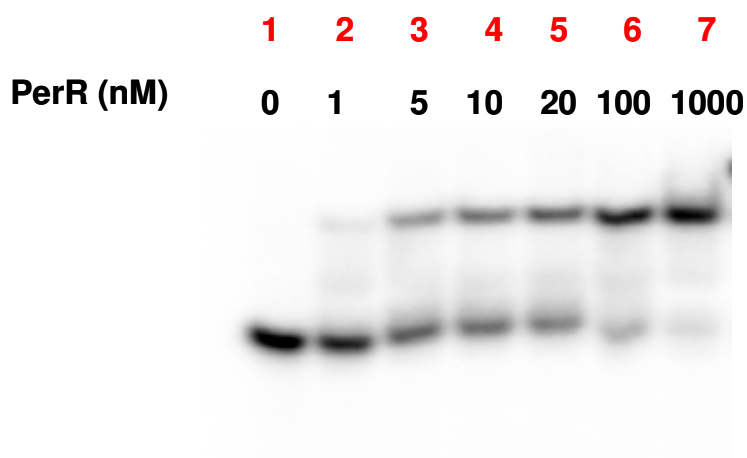


Figure IV.6 : visualisation de l'interaction de PerR, avec la séquence d'ADN non modifiée, par gel retard.

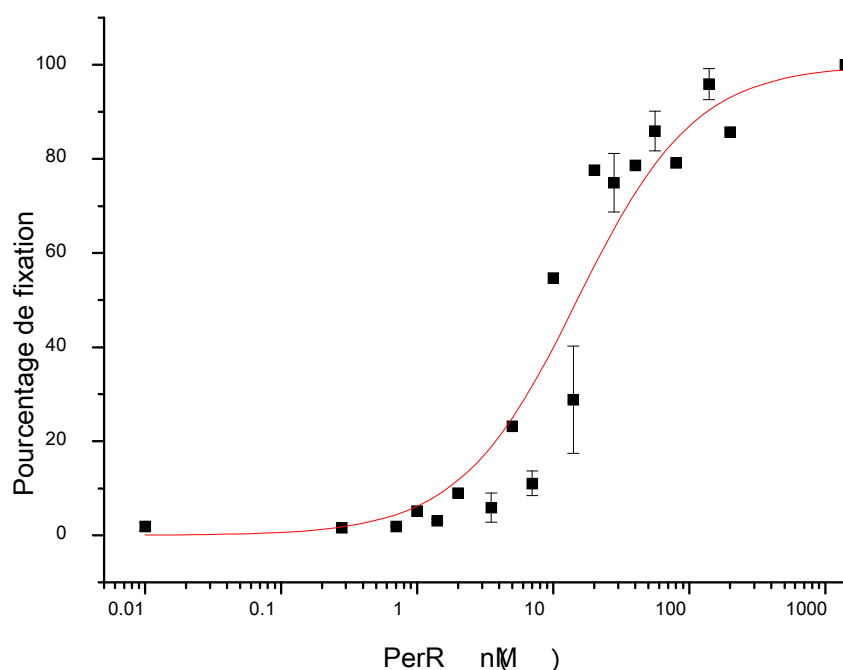


Figure IV.7 : tracé permettant la détermination du K_d PerR-ADN non modifié.

Ces expériences ont été réalisées avec les séquences modifiées. Les constantes de dissociation obtenues pour chaque séquence d'ADN sont reportées sur la figure IV.8. Les expériences de retard sur gel effectuées avec la protéine PerR et la séquence d'ADN non modifiée conduisent à une valeur de K_d d'environ 15 nM. Cette valeur reflète la grande stabilité du complexe ADN-PerR. A l'inverse, la substitution de la thymine en position 2 par

la 8-oxoguanine (séquence OG₂) empêche la formation du complexe ADN-protéine. En effet, l'incubation de l'oligonucléotide OG₂ en présence de concentrations croissantes de PerR (jusqu'à 15 µM, soit 10⁴ équivalents par rapport à l'ADN) n'entraîne pas la formation d'un complexe ADN-protéine visible et retardé sur gel d'électrophorèse.

<u>Oligonucléotides</u>	<u>Valeur de K_d</u>
Séquence non modifiée	15 ± 4 nM
OA ₃	565 ± 133 nM
OA ₅	5 ± 0,5 nM
OA ₁₂	25 ± 5 nM
OG ₂	Aucune fixation

Figure IV.8 : constantes de dissociation associées aux différents oligonucléotides étudiés.

En ce qui concerne les oligonucléotides contenant les 8-oxoadénines, seules les séquences OA₅ et OA₁₂ conduisent à des constantes de dissociation proches de celle obtenue avec l'oligonucléotide non modifié. De façon surprenante, l'oligonucléotide OA₅ conduit à un K_d de l'ordre de 5 nM. Cette valeur indique que la protéine PerR a une meilleure affinité pour le duplex OA₅ que pour la séquence d'ADN non modifiée. La séquence OA₁₂ conduit à une valeur de K_d de l'ordre de 25 nM qui n'est pas très différente de celle obtenue avec la séquence non modifiée. Dans le cas du duplex OA₃, la valeur du K_d est environ de 565 nM soit près de 40 fois supérieure à celle observée pour l'oligonucléotide non modifié. Ce résultat conduit à dire que l'adénine en position 3 est très importante pour la stabilité du complexe ADN-PerR.

La protéine PerR présente donc une bonne affinité pour les oligonucléotides modifiés OA₅ et OA₁₂ comparable à celle pour la séquence non modifiée. Pour les réactions de pontage en présence de sel d'iridium, seules ces deux séquences ont donc été utilisées pour tenter de mettre en évidence les points de contacts entre la protéine et l'ADN.

3) Réactivité en présence de sels d'iridium

Dans un premier temps, nous avons déterminé la concentration optimale de sel d'iridium (Na₂IrCl₆) à utiliser pour oxyder et activer l'oligonucléotide. Cette expérience est

basée sur un test de coupure par une base forte, la pipéridine, du brin d'ADN contenant la base modifiée après oxydation de celle-ci par le sel d'iridium. Il est décrit dans la littérature que les bases normales de l'ADN et les dérivés « 8-oxo » de la guanine et de l'adénine sont stables en milieu alcalin (Cullis *et al.*, 1996). Le traitement d'un oligonucléotide contenant une 8-oxoguanine par une solution de pipéridine 1M à 90°C pendant une heure conduit seulement à environ 10% de coupure de chaîne. En ce qui concerne la 8-oxoadénine, il n'existe pas de données aussi précises dans la littérature, mais on peut estimer que le taux de coupure est également de l'ordre de 10%. Cependant, en présence d'un oxydant à un électron tel que le Na_2IrCl_6 , la 8-oxoguanine comme la 8-oxoadénine évoluent vers des produits sensibles à la pipéridine et conduisent alors à des coupures d'ADN visibles sur gel d'électrophorèse.

La figure IV.9 montre l'effet d'une concentration croissante en Na_2IrCl_6 sur le duplex d'ADN OA_5 . A des concentrations élevées en espèces oxydantes (lignes 4-7), on observe deux bandes. La plus haute représente la migration du brin OA_5 et la plus mobile correspond à ce même brin coupé au niveau de la 8-oxoadénine oxydée. Dans ces conditions, nous observons au maximum 65% de coupure pour une concentration de 1,25 mM en Na_2IrCl_6 (soit 5000 équivalents par rapport à l'ADN). Des concentrations supérieures en Na_2IrCl_6 conduisent à une dégradation non spécifique de l'ADN. Dans la suite de nos expériences, la réaction de pontage ADN(OA_5)-PerR a donc été réalisée avec une concentration de 1,25 mM en sel d'iridium.

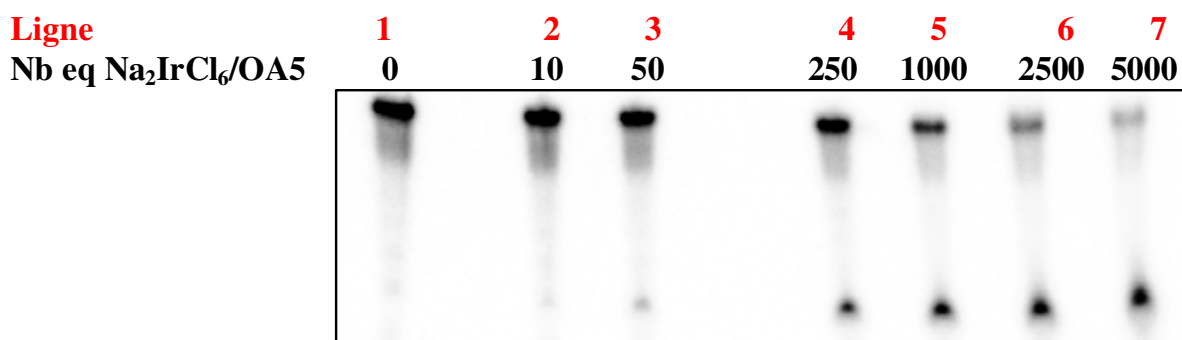


Figure IV.9 : coupure alcaline de l'oligonucléotide OA_5 après oxydation par un sel d'iridium Na_2IrCl_6 .

4) Réaction de pontage covalent ADN-protéine

Les essais de pontage présentés dans ce paragraphe ont été effectués avec l'oligonucléotide OA₅. Ceux réalisés avec OA₁₂ conduisent à des résultats identiques, ils ne sont pas présentés. La figure IV.10 montre un « gel d'électrophorèse type » des différents essais de pontage ADN-PerR. Ces réactions ont été réalisées avec l'oligonucléotide OA₅ (250 nM), la protéine PerR (4 et 47 µM) préalablement métallée avec du Mn²⁺ et enfin le sel d'iridium Na₂IrCl₆ (1,25 mM). Les lignes 3 et 4 de la figure IV.10 correspondent respectivement aux conditions de pontage en présence de PerR à 4 et 47 µM. Les bandes observées sont identiques à celles contenant OA₅ en absence (ligne 1) ou en présence (ligne 2) de Na₂IrCl₆.

ligne	1	2	3	4	5	6	7	8
PerR 4µM	-	-	+	-	+	-	+	-
PerR 47µM	-	-	-	+	-	+	-	+
Na ₂ IrCl ₆	-	+	+	+	+	+	+	+
MnCl ₂	-	-	+	+	-	-	+	+
Pipéridine	-	-	-	-	+	+	+	+

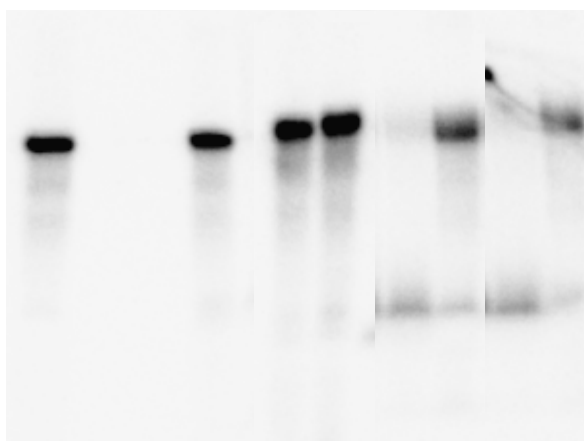


Figure IV.10 : analyse des réactions de pontage OA₅-PerR.

Ce résultat indique clairement qu'il n'y a pas formation d'un adduit OA₅-PerR. En effet, un complexe covalent ADN-PerR, d'un poids moléculaire plus élevé (environ 26,5 kDa correspondant à un monomère de PerR ponté à un simple brin d'ADN), devrait présenter une migration retardée par rapport à l'ADN seul (10 kDa). L'absence d'adduit OA₅-PerR visible sur gel nous a conduit à évaluer l'oxydation de l'oligonucléotide OA₅ par le Na₂IrCl₆ en présence de protéine. En d'autres termes, nous avons cherché à savoir si la protéine pouvait diminuer la réactivité de l'oligonucléotide modifié vis-à-vis du sel d'iridium. Pour cela, des tests de coupure à la pipéridine ont été effectués sur OA₅ en présence de deux concentrations

différentes en protéine après action de l'oxydant. Les lignes 7 et 8 représentent les coupures observées pour des concentrations en protéine de 4 et 47 μM . Dans ces conditions, PerR est métallée et donc fixée sur l'ADN. Les taux de coupure obtenus sont respectivement de l'ordre de 69 % (ligne 7 : PerR 4 μM) et 18 % (ligne 8 : PerR 47 μM). De façon intéressante, ces taux sont très proches de ceux obtenus lorsque la protéine est libre en solution (ligne 5 : 72 %, PerR 4 μM ; ligne 6 : 17 %, PerR 47 μM).

Cette analyse montre que la concentration en protéine joue un rôle majeur dans la réactivité de la base modifiée avec le sel d'iridium. En effet, la présence d'une concentration en protéine de 47 μM diminue d'environ un facteur 4 la réactivité de la 8-oxoadénine (Figure IV.9, ligne 7 et figure IV.10, lignes 6 et 8). Par contre, une concentration en protéine de 4 μM ne modifie pas la réactivité de la 8-oxoadénine vis-à-vis du sel d'iridium (Figure IV.9, ligne 7 et figure IV.10, lignes 5 et 7). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la majeure partie des molécules oxydantes réagit avec la protéine (lorsqu'elle est en large excès par rapport à l'ADN) donc un faible nombre de molécules oxydantes atteint la base modifiée. Le « brut de réaction » obtenu pour une concentration en protéine de 47 μM a été déposé sur gel de protéine SDS-PAGE. Ce dépôt indique que la majorité de la protéine réagit avec le Na_2IrCl_6 et se retrouve sous forme de dimère et d'oligomère (Figure IV.11). Ce phénomène peut être lié au fait que le potentiel d'oxydo-réduction des chaînes latérales de certains acides aminés est identique voire plus bas que celui de la base d'ADN modifiée et donc que ces acides aminés réagissent plus facilement avec le sel d'iridium (Johansen *et al.*, 2005). L'absence de pontage ADN-protéine, lorsque nous avons travaillé dans les conditions les plus favorables (PerR à 4 μM), peut s'expliquer par l'éloignement des acides aminés nucléophiles de PerR par rapport à la forme réactive de la 8-oxoadénine. Il faut également noter que de nombreux travaux décrits dans la littérature soulignent le fait que la caractérisation d'un adduit ADN-protéine est souvent rendue compliquée du fait de l'instabilité du lien covalent. Cette instabilité est souvent liée aux conditions de l'analyse. Par exemple, l'analyse sur gel d'électrophorèse implique la dénaturation du complexe pendant 5 min à 90°C dans une solution basique. Certains auteurs indiquent également une possible dégradation du complexe ADN-protéine lors de l'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF due à l'acidité de la matrice avec laquelle sont déposés les échantillons (Hickerson *et al.*, 1999).

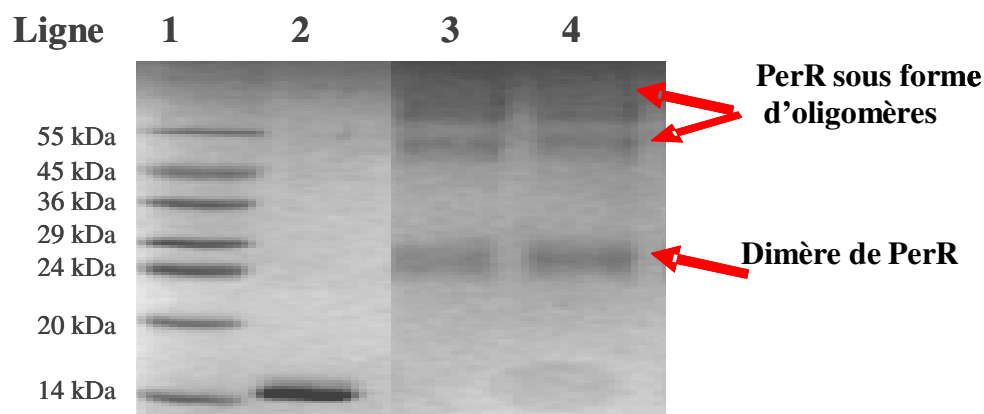


Figure IV.11 : oxydation de PerR par le sel d'iridium. Ligne 1 : marqueur de taille ; ligne 2 : protéine PerR; ligne 3 : PerR + Na_2IrCl_6 ; ligne 4 : PerR + OA_5 + MnCL_2 + Na_2IrCl_6 .

Cette première approche n'a donc pas permis de mettre en évidence les acides aminés impliqués dans l'interaction de la protéine avec sa séquence de reconnaissance. Cependant, les modifications réalisées au niveau de cette séquence ont permis de montrer l'importance de la thymine située en position 2 (T2) ainsi que de l'adénine en position 3 (A3). En effet, PerR n'est pas capable de se fixer sur l'ADN lorsque T2 est modifiée en 8-oxoguanine et présente une affinité beaucoup plus faible lorsqu'A3 est modifiée en 8-oxoadénine. Ces nucléotides en position 2 et 3 apparaissent donc comme cruciaux dans la reconnaissance de l'ADN par PerR.

II. Mutagénèse dirigée.

1) Principe

La seconde approche mise en œuvre pour déterminer les points de contacts entre la protéine et sa séquence de reconnaissance est basée sur le modèle de la forme active présenté dans le chapitre III. Comme nous l'avons mentionné précédemment, ce modèle a été obtenu à partir de la structure cristallographique de la protéine PerR-Zn obtenue au laboratoire et de la structure de la forme active de Fur de *P. aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003). Ce modèle correspond à la forme métallée de la protéine capable de fixer l'ADN. Il permet donc de mettre en évidence les acides aminés potentiellement impliqués dans l'interaction avec la

séquence de reconnaissance. Notre démarche a donc été de muter ces acides aminés afin d'évaluer leur importance dans la formation du complexe ADN-PerR.

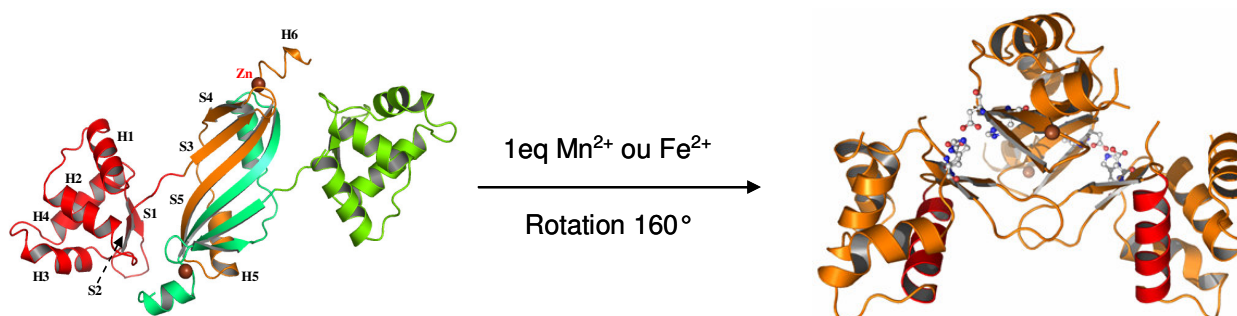


Figure IV.12 : activation de la forme PerR-Zn (à gauche) en forme Per-Zn-Fe ou Per-Zn-Mn (à droite) par fixation du métal régulateur.

Comme représenté sur la figure IV.12, la fixation du métal régulateur (Mn^{2+} ou Fe^{2+}) par la forme PerR-Zn entraîne un changement de conformation et conduit au modèle de la forme active de la protéine. De façon schématique, dans ce modèle en forme de « pince », les deux hélices H4 (hélices impliquées dans la liaison avec l'ADN) sont orientées de façon perpendiculaire ce qui permet de fixer l'ADN. L'hélice H4, composée de 15 acides aminés, se trouve au sein du motif hélice coude hélice (H3-T-H4) qui est conservé dans la majorité des protéines de la famille de la protéine Fur. Le positionnement des différents acides aminés le long des deux hélices H4, nous a permis d'identifier cinq acides aminés potentiellement engagés dans des contacts avec l'ADN : les résidus Tyr60, Arg67, Arg64, Asn61 et Glu68. La chaîne latérale de ces acides aminés est dirigée vers l'intérieur de la pince formée par la protéine. Ce positionnement de la chaîne latérale permet très probablement leur contact avec l'ADN via des liaisons hydrogène ou des interactions hydrophobes. La mutation de ces acides aminés par un acide aminé ne possédant pas de chaîne latérale devrait permettre d'abolir les interactions entre la protéine et l'ADN. Nous avons choisi de muter ces cinq résidus en glycine car cet acide aminé ne possède pas de chaîne latérale et toute interaction liée à des liaisons hydrogène ou des interactions hydrophobes est ainsi annulée. L'affinité pour l'ADN des protéines PerR-Y60G, PerR-R67G, PerR-R64G, PerR-N61G et PerR-E68G, correspondant respectivement aux mutations des Tyr60, Arg67, Arg64, Asn61 et Glu68 en glycine, a été évaluée sur gel d'électrophorèse par la technique du retard sur gel. Ces

expériences devraient permettre de déduire l'importance de ces acides aminés dans la reconnaissance de l'ADN par PerR.

2) Etude de l'interaction des mutants de PerR avec l'ADN

L'oligonucléotide non modifié, contenant la séquence du promoteur de *mrgA* reconnue par PerR, a été utilisé dans ces expériences ([ADN] = 0,2 nM). Son extrémité 5' est marquée au ^{32}P radioactif pour les expériences de retard sur gel. La figure IV.13 présente les gels obtenus pour les différents mutants de PerR. Les figures IV.13 A, B, C, et D indiquent que les protéines PerR-Y60G, PerR-R67G, PerR-R64G et PerR-N61G ne se fixent pas sur l'ADN. Par contre, la figure IV.13E montre que la protéine PerR-E68G est active et se fixe sur l'ADN. Cette figure présente donc la formation du complexe entre PerR-E68G et l'ADN en fonction de la concentration en protéine. Dans un souci de reproductibilité, cette expérience a été réalisée trois fois.

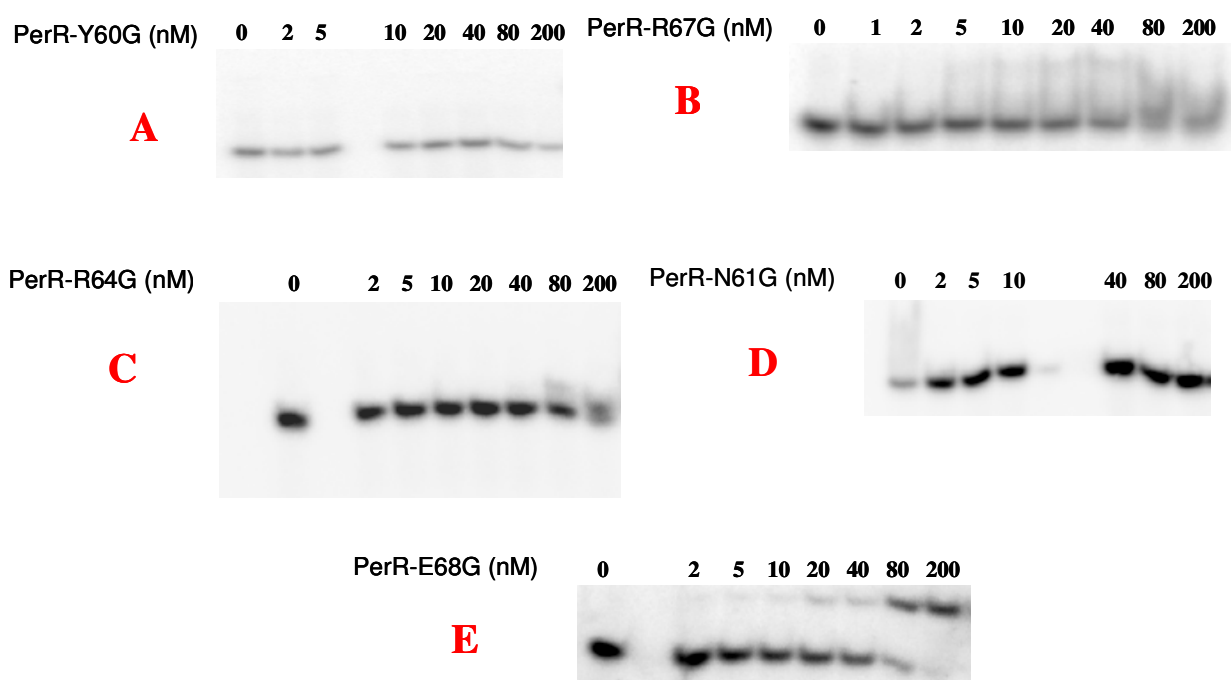


Figure IV.13 : étude de l'interaction entre les différents mutants PerR et la séquence d'ADN non modifiée par des expériences de gel retard.

La valeur de la constante de dissociation est déterminée, en utilisant l'équation que nous avons démontrée au début de ce chapitre :

$$y = 250 \left((0.2 + x + K_d) - \sqrt{(0.2 + x + K_d)^2 - 0.8x} \right)$$

A partir de cette équation, le graphe représenté sur la figure IV.14 a pu être tracé. Il représente le pourcentage de complexe ADN-PerR-E68G formé en fonction de la concentration en PerR-E68G. Dans le cas de ce mutant, la valeur du K_d est de 82 nM (+/- 13).

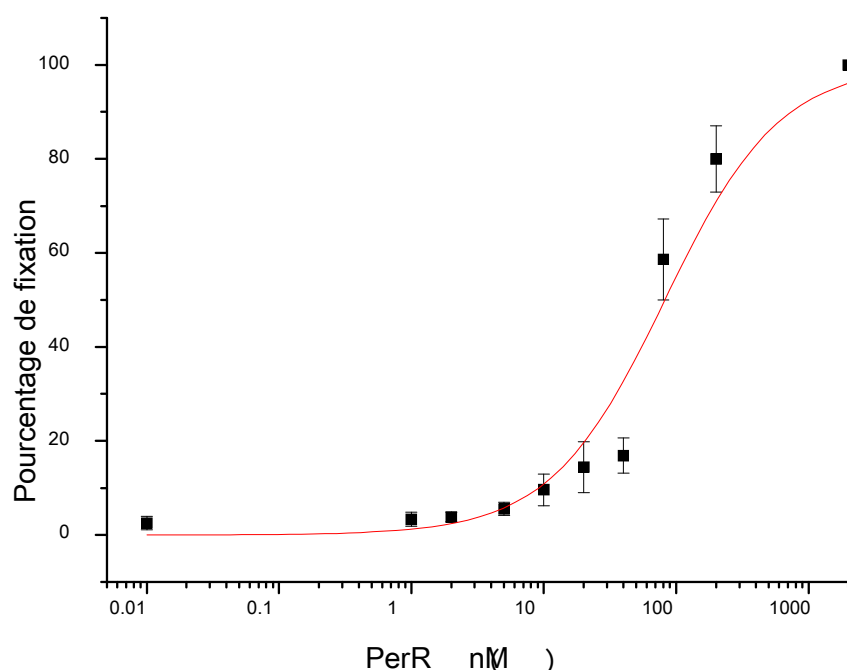


Figure IV.14 : détermination du K_d du complexe PerR-E68G-ADN non modifié.

Les résultats des expériences de retard sur gel montrent l'absence de fixation des protéines PerR-Y60G, PerR-N61G, PerR-R64G et PerR-R67G sur la séquence d'ADN. En effet, même avec 1000 équivalents de protéine (200 nM) par rapport à l'ADN on ne détecte aucune fixation. Ces résultats suggèrent un rôle clé pour chacun de ces acides aminés dans la reconnaissance de l'ADN par la protéine PerR. Dans le cas du mutant PerR-R67G, la présence de traînées sur le gel témoigne d'un complexe ADN-protéine peu stable se dissociant dans le gel. Comme nous l'avons mentionné, la formation du complexe PerR-E68G-ADN conduit à une valeur de K_d d'environ 82 nM (+/-13). Cette valeur de K_d obtenue avec le mutant PerR-E68G suggère que l'acide glutamique en position 68 au niveau de l'hélice H4 a

une contribution mineure dans l'interaction de PerR avec l'ADN en comparaison avec les quatre autres acides aminés étudiés (Y60, N61, R64 et R67).

A partir de ces résultats, nous pouvons avancer l'hypothèse que ce sont les acides aminés situés en début de l'hélice H4 qui contribuent à l'interaction de PerR avec l'ADN. En effet, la mutation des résidus 60, 61, 64 et 67 empêche la formation du complexe ADN-PerR alors que la mutation du résidu 68 diminue l'affinité de la protéine sans toutefois l'annuler.

III. Conclusion.

Deux approches complémentaires ont été mises en œuvre pour étudier l'interaction de PerR avec sa séquence de reconnaissance et évaluer les bases de la spécificité de cette interaction. Dans un premier temps, l'ADN a été modifié afin de mettre en évidence par des réactions de pontage les nucléotides essentiels à la reconnaissance de l'ADN par PerR. Dans un deuxième temps, la protéine a été modifiée pour déterminer les acides aminés essentiels à la formation du complexe ADN-PerR. Ces deux approches nous ont permis d'avancer dans la compréhension du mode d'interaction de la protéine PerR avec l'ADN. En effet, les expériences de mutagenèse dirigée ont mis en évidence un certain nombre d'acides aminés indispensables à cette interaction. Les cinq mutations que nous avons réalisées nous permettent de conclure que les chaînes latérales de la tyrosine 60, de l'asparagine 61 et des arginines 64 et 67 sont impliquées dans la formation du complexe ADN-PerR. D'autre part, les expériences de retard sur gel indiquent que les bases en position 2 (thymine) et 3 (adénine) de la séquence d'ADN sont essentielles à la fixation de PerR.

Malheureusement nous n'avons pas mis en évidence de complexe covalent ADN-PerR avec les expériences de pontage basées sur la réactivité d'oligonucléotides modifiés contenant une 8-oxoadénine. Ce résultat est très certainement lié à l'éloignement du site réactif sur la base modifiée et les nucléophiles protéiques. L'oxydation de la protéine par le sel d'iridium peut également expliquer ce résultat. Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure une réactivité préférentielle de l'espèce réactive de la 8-oxoadénine avec un autre nucléophile du milieu réactionnel tel que l'eau. Les mesures de K_d de PerR pour les séquences modifiées ont montré que la protéine présente une meilleure affinité pour OA₅ que pour la séquence non modifiée ($K_d = 5$ nM). Une explication possible est que l'atome d'oxygène en position 8 de la 8-oxoadénine peut interagir de manière non covalente avec un acide aminé proche via une

liaison hydrogène. Le renforcement du réseau de liaisons hydrogène pourrait alors contribuer à une meilleure stabilité du complexe ADN-protéine. Par contre, dans le cas d'OA₃, le K_d est égal à 565 nM. La présence de l'atome d'oxygène supplémentaire entraîne probablement une gêne stérique ce qui déstabilise le complexe ADN-protéine.

En perspective à ce travail, l'activation de l'ADN par voie photochimique peut être envisagée pour mettre en évidence des produits de pontage ADN-PerR. Des dérivés de la thymine tels que le 5-iodouracile, le 4-thiouracile ou encore le 4-thiothymine sont alors incorporés à l'ADN. En ce qui concerne la mutagénèse dirigée, l'expression et la purification de mutants correspondants aux mutations des résidus 62, 63, 65 et 66 sont actuellement en cours. L'ensemble de ce travail devrait donc permettre d'avoir une vision plus claire des zones d'interaction entre les deux polymères.

IV. Discussion.

1) La stoechiométrie du complexe ADN-PerR

A ce jour, dans la classe des métallorégulateurs à laquelle appartient PerR, seules les protéines IdeR et DtxR ont été cristallisées sous forme de complexe avec l'ADN (Wisedchaisri *et al.*, 2004 ; White *et al.*, 1998). De manière analogue à PerR, DtxR de *Corynebacterium diphtheriae*, qui est également dimérique (2*226 acides aminés), utilise le Fe²⁺ comme co-répresseur pour se lier à l'ADN. Le domaine N-terminal (73 acides aminés) est impliqué dans la reconnaissance de l'ADN avec les hélices notées B et C sur la figure IV.15 qui constituent un motif hélice-coude-hélice (Qiu *et al.*, 1995; White *et al.*, 1998). Ces hélices sont suivies de deux petits feuillets β antiparallèles. Un second domaine, formé par les résidus 74 à 144, est impliqué dans la liaison du métal. Enfin, la partie C-terminale constitue un troisième domaine, plus mobile et mal résolu dans les structures cristallographiques et dont la fonction n'est pas clairement définie. Ce domaine n'a pas d'équivalent chez PerR. Chaque monomère contient deux sites métalliques dont l'un est impliqué dans l'activation de la protéine (Ding *et al.*, 1996). Ce site d'activation est octaédrique, avec des ligands appartenant principalement au second domaine (C102, E105, H106 et D120) et un ligand appartenant au domaine N-terminal. La sphère de coordination est complétée par une molécule d'eau. La fixation du métal d'activation provoque un léger mouvement de tenailles et rapproche de 2 Å

les hélices de reconnaissance de chacun des monomères, ce qui permet leur insertion dans deux grands sillons consécutifs de l'ADN. La boucle constituée des résidus 57-60 reliant les deux petits feuillets β subit également un réarrangement qui permet à l'arginine 60 de venir s'insérer dans le petit sillon de l'ADN.

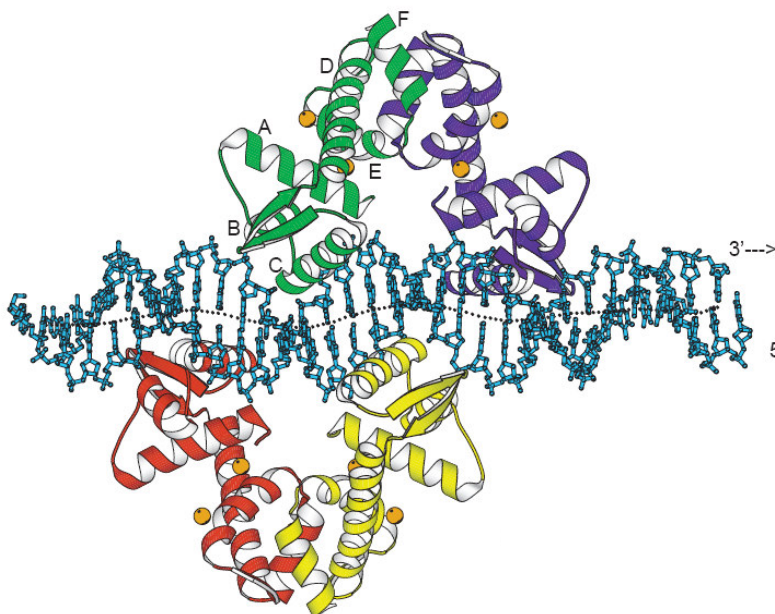


Figure IV.15 : représentation de la structure cristallographique des résidus 3-120 de la protéine DtxR métallée avec du Ni^{2+} et liée à l'ADN (opérateur *tox*). Deux dimères sont fixés de part et d'autre du duplex d'ADN de 33 paires de bases. Les atomes de Ni^{2+} sont symbolisés par les boules orange.

Il n'est bien sûr pas possible d'extrapoler les résultats obtenus pour DtxR à PerR de *B. subtilis*. Cependant, on peut supposer que son mode d'interaction avec l'ADN est proche de celui de la protéine DtxR et on peut donc supposer que la forme active de PerR partage des similitudes avec celle de DtxR. Le modèle de la forme active que nous proposons indique que les ligands potentiels du site de régulation de PerR appartiennent tous au domaine C-terminal sauf l'histidine 37 située au niveau du domaine N-terminal. La coordination de cette histidine 37 au métal régulateur permettrait donc, comme dans le cas de DtxR, de « refermer » la protéine et de stabiliser la forme active capable de fixer l'ADN. Cette hypothèse est appuyée par nos expériences en spectroscopie de fluorescence qui ont mis en évidence un changement de conformation en solution de la protéine après métallation par le Mn^{2+} .

La structure cristallographique ADN-DtxR indique que deux dimères de DtxR interagissent avec l'ADN au niveau de la séquence de reconnaissance (White *et al.*, 1998).. On peut donc se demander si PerR observe la même stœchiométrie dans son interaction avec l'ADN. Dans le cas de la protéine Fur d'*E. coli*, cette interaction a été étudiée en détail et a

récemment fait l'objet de controverses (Baichoo & Helmann, 2002; Escolar *et al.*, 1998; Lavrrar & McIntosh, 2003). La séquence consensus de reconnaissance de la protéine Fur est une séquence palindromique du type 9-1-9 (GATAATGATNATCATTATC ; N = A ou T). Suite à des expériences d'empreinte sur gel (observation d'une empreinte de 31 pb), les auteurs ont proposé qu'une seule protéine Fur dimérique se lie à cette séquence de reconnaissance. Cependant, l'observation d'empreintes sur gel plus étendues et non multiples de 31 pb, au niveau de différents sites de reconnaissance, ne peut pas être expliqué par un simple modèle 1 : 1 (Lavrrar *et al.*, 2002). Des études plus précises ont donc été entreprises à l'aide d'oligonucléotides modifiés. Suite à ces expériences, Escolar *et al.* (Escolar *et al.*, 1998; Escolar *et al.*, 1999) proposent, chez *E. coli*, une réinterprétation de la « Fur-box » comme la triple répétition d'un motif de 6 pb (NATWAT, N = A ou T, W = C ou G). Chez *B. subtilis*, l'analyse des gènes régulés par Fur a conduit à une nouvelle proposition pour l'interaction de cette protéine avec l'ADN. Chez cet organisme, la séquence de reconnaissance de Fur n'est constituée que de 2 motifs de 6 pb présents au sein d'une séquence palindromique 7-1-7 (Baichoo & Helmann, 2002; Fuangthong & Helmann, 2003). En conclusion, ces auteurs proposent que chez *E. coli*, la « Fur-box » de 19 pb qui correspond au chevauchement de deux motifs 7-1-7, est reconnue par deux dimères de Fur. Dans ce modèle, chaque dimère interagit avec un motif 7-1-7 de part et d'autre de l'hélice l'ADN de manière analogue à DtxR (Figures IV.15 et IV.16). Ce modèle ainsi que son extension à 3 ou 4 protéines dimériques Fur liées à l'ADN permet de mieux comprendre les expériences d'empreintes sur gel qui ont mis en évidence des zones étendues au niveau de promoteurs reconnus par Fur (Lavrrar *et al.*, 2002).

La figure IV.16 montre qu'un seul dimère de Fur se lie par « motif 7-1-7 ». Il est intéressant de noter que, chez *B. subtilis*, la séquence reconnue par Fur est très proche de celle de la protéine PerR (simple mutation au niveau de la position 2 où une thymine est remplacée par une guanine). Nous pouvons donc supposer, que chez *B. subtilis*, un seul dimère de PerR se fixe au niveau d'une séquence 7-1-7 selon un mode d'interaction similaire à celui de la protéine Fur.

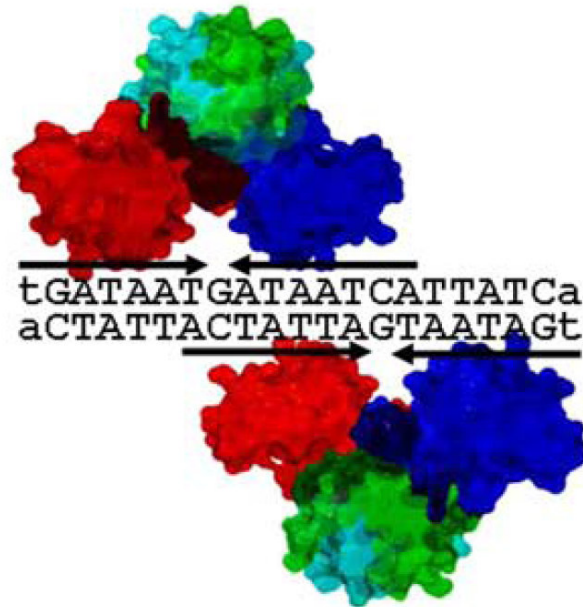


Figure IV.16 : modèle d'interaction de Fur de *P. aeruginosa* avec l'ADN. Les domaines N-terminaux sont en rouge et bleu. Les domaines C-terminaux sont en vert (Lee & Helmann, 2007).

2) La spécificité de reconnaissance ADN-PerR

Dans le cas de la protéine Fur d'*E. coli*, une étude visant à déterminer les acides aminés de Fur impliqués dans la reconnaissance de l'ADN a été réalisée (Tiss *et al.*, 2005). En modifiant des bases de l'ADN pour réaliser un pontage par voie photochimique, les auteurs ont mis en évidence un lien covalent entre Fur et sa séquence de reconnaissance. Ce pontage a pu être caractérisé ; il implique la tyrosine 55 ainsi que les thymine en position 15 et 16 de la « Fur-box » (Figure IV.17A). La tyrosine 55 est présente au sein d'un motif TXY (où X est une valine ou une isoleucine) conservé chez les protéines Fur et Zur d'*E. coli*, les protéines Zur, Fur et PerR de *B. subtilis* et Fur de *P. aeruginosa* (Figure IV.17B). Cette observation indique que ce motif peut être impliqué dans la liaison à l'ADN. De plus, les thymine 15 et 16 de la boîte Fur chez *E. coli* sont également conservées au sein des séquences de reconnaissance des protéines « Fur-like » de *B. subtilis*.

3 6 9 12 15 16 18
 5' GATAATGATAATCATTATC

Figure IV.17A : séquence de reconnaissance de Fur d'*E. coli*.

Fur <i>E. coli</i>	MTDNNTALKKAGLKVTLPRLKILEVLQEPDNHVS A EDLYKRLIDMGEEIGLAT TVYRV LNQFDDA GIV TR
Fur <i>P. aeru.</i>	MVENSELRKAGLKVTLP PR VKILQMLDSAEQR HMSA EDVYKALMEAGEDVGLAT TVYRV LTQFEAA GLV VR
Fur <i>B. subt.</i>	MENRIDRIKKQLHSSSYKLT PQ REATVRVLL ENEEDHLSA EDVYLLVKEKSPEIGLAT TVYRT LELLTELKV V DK
PerR <i>B. subt.</i>	MAAHELKEALET LK ETGVRIT PQ RHAILEYLVNSMA HPTA DDIYKAL EG KFPNMSVAT TVYNN LRVFRES GLV KE
Zur <i>B. subt.</i>	MNVQEALNLLKNGYKYTNKREDMLQLFADSDRYLT AK NVLSALND DYPGL SFD TIYRN LSLYEEL G IET
Zur <i>E. coli</i>	MEKTTTQELLAQA E KICAQRNVRLT PQ RLEVLRLMSLQDGAIS A YDLLDL L REAEPQAK PP TVY R ALDFLLEQ G FVHK

Figure IV.17B : alignement des séquences de protéines « Fur-like ».

L'ensemble de ces résultats suggère que les tyrosines de chaque protéine (en position 60 pour Fur et PerR et en position 57 pour Zur chez *B. subtilis*) sont impliquées dans la formation du complexe ADN-protéine et qu'elles sont très probablement en interaction avec les deux thymines conservées. Nous avons montré que la tyrosine 60 de PerR de *B. subtilis* participe à la formation du complexe ADN-PerR (Figure IV.13A). Ces deux éléments (doublet de thymines et tyrosine) semblent donc constituer les caractéristiques communes aux différentes protéines « Fur-like » dans leur interaction avec l'ADN. Ces homologies au niveau des acides aminés et des acides nucléiques suggèrent que les protéines Fur, Zur et PerR, chez *B. subtilis* pourraient ne pas reconnaître exclusivement que leur séquence consensus. Cependant, comme nous l'avons mentionné précédemment, chez *B. subtilis*, Fuangthong et Helmann ont montré qu'il n'existe pas de co-régulation ni *in vivo* ni *in vitro* entre ces trois protéines (Fuangthong & Helmann, 2003). Ce résultat indique que la nature différente des acides aminés présents au sein de l'hélice de liaison à l'ADN est responsable de la spécificité de fixation de chaque protéine.

Nos résultats permettent d'éclaircir certains paramètres de l'interaction de PerR avec l'ADN. Nous avons montré que les résidus asparagine 61 et arginines 64 et 67 sont impliqués dans la formation du complexe ADN-PerR. Les alignements de séquence montrent que ces résidus ne sont pas conservés chez Fur et Zur. Nous avons également montré que les nucléotides en position 2 et 3 de la séquence oligonucléotidique sont indispensables à l'interaction de la protéine PerR avec l'ADN. Ces nucléotides ne sont pas conservés dans les séquences reconnues par les protéines Fur et Zur. Ces deux nucléotides et les résidus N61, R64 et R67 sont très probablement responsables de la spécificité de reconnaissance de PerR. Ces résultats sur la formation du complexe ADN-PerR viennent donc compléter les données de la littérature.

Cependant, d'autres paramètres peuvent également être à l'origine de la spécificité de reconnaissance, *in vivo*, de chaque homologue de PerR. Par exemple, chez *B. subtilis*, les « PerR-box » sont généralement isolées alors que la présence contiguë de deux « Fur-box » ou

plus est souvent observée (Baichoo & Helmann, 2002; Herbig & Helmann, 2001). Cette observation suggère que la coopérativité au niveau des sites de fixation est importante pour l'activité de répresseur de Fur. En ce qui concerne Zur, la présence de trois bases supplémentaires de part et d'autre de la séquence consensus 7-1-7 est nécessaire pour la reconnaissance de l'ADN. Certains facteurs de régulation peuvent aussi influencer le comportement de ces métallo-régulateurs. Par exemple, il a été montré que des protéines « histone-like » contribuent à la régulation de Fur chez *E. coli* (Dubrac & Touati, 2000) en modifiant très probablement la conformation de l'ADN (Atlung & Ingmer, 1997).

Anderson, W. F., Ohlendorf, D. H., Takeda, Y. & Matthews, B. W. (1981). Structure of the cro repressor from bacteriophage lambda and its interaction with DNA. *Nature* **290**: 754-758.

Atlung, T. & Ingmer, H. (1997). H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol Microbiol* **24**: 7-17.

Baichoo, N. & Helmann, J. D. (2002). Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**: 5826-5832.

Blatter, E. E., Ebright, Y. W. & Ebright, R. H. (1992). Identification of an amino acid-base contact in the GCN4-DNA complex by bromouracil-mediated photocrosslinking. *Nature* **359**: 650-652.

Brennan, R. G. (1992). Interactions of the helix-turn-helix binding domain. *Curr Opin Struct Biol* **2**: 100-108.

Cullis, P. M., Malone, M. E. & MersonDavies, L. A. (1996). Guanine radical cations are precursors of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine but are not precursors of immediate strand breaks in DNA. *J Am Chem Soc* **118**: 2775-2781.

Ding, X., Zeng, H., Schiering, N., Ringe, D. & Murphy, J. R. (1996). Identification of the primary metal ion-activation sites of the diphtheria, tox repressor by X-ray crystallography and site-directed mutational analysis. *Nat Struct Biol* **3**: 382-387.

Dubrac, S. & Touati, D. (2000). Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the sodB promoter. *J Bacteriol* **182**: 3802-3808.

Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1998). Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* **283**: 537-547.

Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**: 6223-6229.

Fuangthong, M. & Helmann, J. D. (2003). Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 6348-6357.

Herbig, A. F. & Helmann, J. D. (2001). Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* **41**: 849-859.

Hickerson, R. P., Chepanoske, C. L., Williams, S. D., David, S. S. & Burrows, C. J. (1999). Mechanism-based DNA-protein cross-linking of MutY via oxidation of 8-oxoguanosine. *J Am Chem Soc* **121**: 9901-9902.

Johansen, M. E., Muller, J. G., Xu, X. & Burrows, C. J. (2005). Oxidatively induced DNA-protein cross-linking between single-stranded binding protein and oligodeoxynucleotides containing 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Biochemistry* **44**: 5660-5671.

Lavrrar, J. L. & McIntosh, M. A. (2003). Architecture of a fur binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* **185**: 2194-2202.

Lavrrar, J. L., Christoffersen, C. A. & McIntosh, M. A. (2002). Fur-DNA interactions at the bidirectional fepDGC-entS promoter region in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **322**: 983-995.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2007). Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**: 485-499.

McKay, D. B. & Steitz, T. A. (1981). Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* **290**: 744-749.

Pohl, E., Holmes, R. K. & Hol, W. G. (1998). Motion of the DNA-binding domain with respect to the core of the diphtheria toxin repressor (DtxR) revealed in the crystal structures of apo- and holo-DtxR. *J Biol Chem* **273**: 22420-22427.

Pohl, E., Holmes, R. K. & Hol, W. G. (1999). Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *J Mol Biol* **285**: 1145-1156.

Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. & Vasil, M. L. (2003). Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**: 903-915.

Qiu, X. Y., Verlinde, C. L. M. J., Zhang, S. P., Schmitt, M. P., Holmes, R. K. & Hol, W. G. J. (1995). 3-Dimensional Structure of the Diphtheria-Toxin Repressor in Complex with Divalent-Cation Co-Repressors. *Structure* **3**: 87-100.

Tiss, A., Barre, O., Michaud-Soret, I. & Forest, E. (2005). Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from *Escherichia coli* by UV crosslinking and mass spectrometry. *FEBS Lett* **579**: 5454-5460.

Wong, D. L., Pavlovich, J. G. & Reich, N. O. (1998). Electrospray ionization mass spectrometric characterization of photocrosslinked DNA-EcoRI DNA methyltransferase complexes. *Nucleic Acids Res* **26**: 645-649.

White, A., Ding, X. C., vanderSpek, J. C., Murphy, J. R. & Ringe, D. (1998). Structure of the metal-ion-activated diphtheria toxin repressor tox operator complex. *Nature* **394**: 502-506.

Wisedchaisri, G., Holmes, R. K. & Hol, W. G. (2004). Crystal structure of an IdeR-DNA complex reveals a conformational change in activated IdeR for base-specific interactions. *J Mol Biol* **342**: 1155-1169.

Chapitre V

**La 2-oxo-histidine, marqueur de
l'oxydation de PerR.**

Nous venons de le voir dans le chapitre précédent, l'activité de PerR réside dans son interaction très spécifique avec l'ADN. *In vivo*, en condition de stress oxydant lié à une augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène, cette interaction est abolie et il y a levée de répression des gènes régulés par PerR.

Au début de ces travaux, le mécanisme réactionnel de détection d'H₂O₂ par PerR n'était pas connu. Nous avons vu dans l'introduction bibliographique que les principales hypothèses pour ce mécanisme impliquaient les cystéines de la protéine (Gaballa & Helmann, 2002; Herbig & Helmann, 2001). La structure cristallographique de PerR, détaillée dans le chapitre II des résultats, a montré que les quatre cystéines de chaque monomère étaient impliquées dans la complexation du zinc selon un motif Zn(Cys)₄ essentiel à la stabilité du dimère. Nos données biochimiques ont confirmé le rôle structural du site à zinc. En effet, l'oxydation de ce site par H₂O₂ est beaucoup trop lente pour rendre compte de l'activité de senseur d'H₂O₂ de la protéine *in vivo* (Traore *et al.*, 2006).

En parallèle de nos travaux, le groupe de J.D. Helmann a proposé, en réalisant des expériences de réactivité avec du peroxyde d'hydrogène enrichi isotopiquement et après analyse en spectrométrie de masse, qu'en présence de H₂O₂, la réaction localisée sur le métal de régulation (Fe²⁺) entraînait l'oxydation des résidus histidines supposés lier le Fe²⁺ (Lee & Helmann, 2006). Cette oxydation irréversible entraîne la perte du métal et la dissociation du complexe ADN-protéine. Selon ces auteurs, H₂O₂ réagit avec le Fe²⁺ selon une réaction de type Fenton conduisant à la formation du radical hydroxyle OH[•]. Ce radical oxyde ensuite sélectivement une ou deux histidines du site actif en 2-oxohistidine (voir introduction). A ce jour, la nature de l'oxydation n'a pas été formellement identifiée et le rôle du radical hydroxyle n'a pas été clairement démontré.

Une alternative possible à ce mécanisme implique la formation d'une espèce réactive du fer à haut degré d'oxydation telle qu'une espèce fer-oxo (Figure V.1). Une telle espèce a, par exemple, été mise en évidence dans les dioxygénases α -cétoglutarate dépendantes (Farquhar *et al.*, 2005; Hoffart *et al.*, 2006). En raison de sa forte réactivité, le radical hydroxyle cause généralement des dommages non spécifiques plutôt que des oxydations très localisées comme cela est supposé pour PerR. La formation d'une espèce fer-oxo permettrait d'expliquer l'oxydation très spécifique de PerR en présence d'H₂O₂.

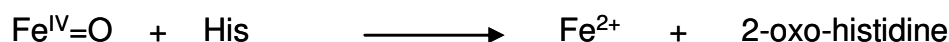
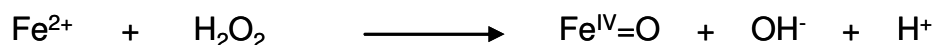


Figure V.1 : mécanisme réactionnel impliquant une espèce $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ dans la formation de la 2-oxo-histidine.

En se basant sur les résultats du groupe de J.D. Helmann, la 2-oxo-histidine représente le « marqueur biologique » de l'oxydation de PerR. Notre premier objectif a donc été d'identifier clairement cet acide aminé modifié dans une forme oxydée de PerR. Une méthode de détection et de quantification de la 2-oxo-histidine a donc été mise au point. Différentes techniques permettant la détection de cet acide aminé modifié sont décrites dans la littérature. Par exemple, K. Uchida et S. Kawakishi ont proposé une méthode basée sur la technique d'HPLC (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography) couplée à une détection par électrochimie (Uchida & Kawakishi, 1993) pour mesurer le taux de 2-oxo-histidine au sein de la superoxyde dismutase à Cu/Zn (Uchida & Kawakishi, 1994). Nous avons opté dans nos travaux pour la technique d'HPLC couplée à la spectrométrie de masse. Cette technique offre une grande sensibilité dans la détection. Dans la pratique, la synthèse d'un standard de 2-oxo-histidine a été réalisée suivant le mode opératoire détaillé dans la suite de ce chapitre.

Le second objectif de ce travail a été de mieux comprendre le mécanisme de détection d' H_2O_2 par PerR, en d'autres termes, tenter de déterminer le chemin réactionnel permettant de trancher entre une voie radicalaire impliquant le radical hydroxyle ou une réaction via une espèce métallique à haut degré d'oxydation (tel que le $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$).

I. Synthèse et détection de la 2-oxo-histidine.

1) Synthèse d'une solution calibrée de 2-oxo-histidine

La synthèse d'un standard de 2-oxo-histidine a été réalisée à partir du protocole décrit initialement par Uchida et Kawakishi (Uchida & Kawakishi, 1994) auquel les modifications de Lewish et Levine ont été apportées (Lewisch & Levine, 1995). Le réactif de départ est la N-benzoylhistidine qui est un composé commercial (Figure V.2A). Celui-ci a été oxydé par le système « Cu^{2+} /ascorbate » générateur de radicaux hydroxyle (Stadtman, 1990). La réaction a

lieu pendant 48h sous bullage d'oxygène (le protocole est détaillé dans la partie expérimentale). L'ascorbate, en tant que donneur d'électrons, réduit le Cu^{2+} en Cu^+ et O_2 en H_2O_2 . Les espèces Cu^+ et H_2O_2 ainsi générées vont alors réagir selon la réaction de Fenton et conduire à la production de radicaux hydroxyles. Ces radicaux réagissent alors avec le composé de départ, la N-benzoylhistidine. De nombreux produits sont formés dont la N-benzoyl-2-oxo-histidine qui est isolée par HPLC à l'aide d'un détecteur réglé à 240 nm (Figure V.2B).

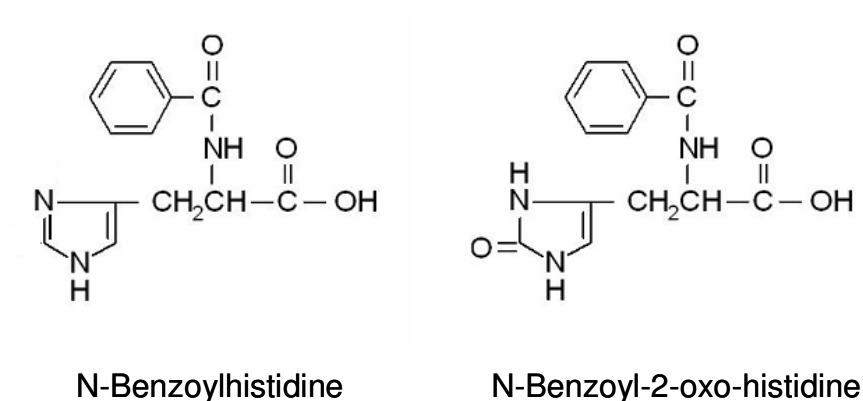


Figure V.2A : structures développées de la N-benzoylhistidine et de la N-benzoyl-2-oxo-histidine.

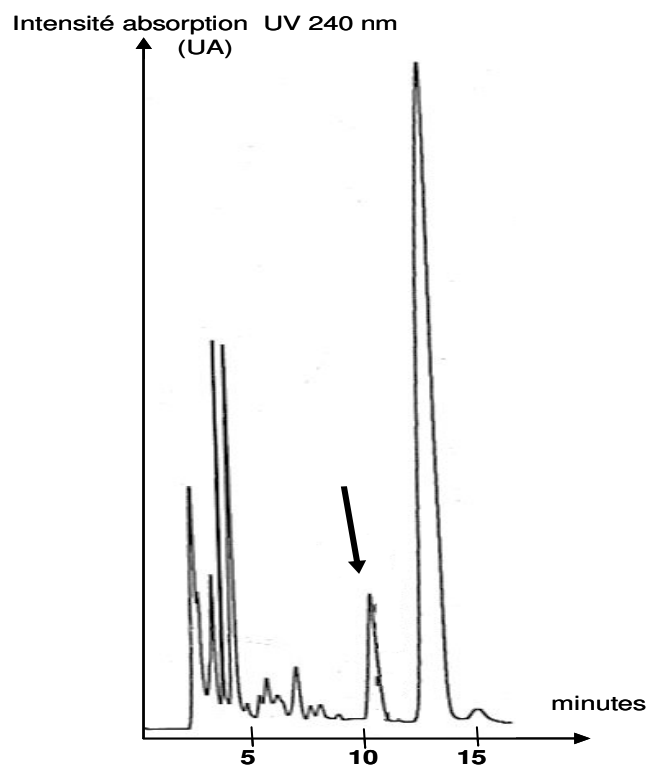


Figure V.2B : chromatogramme obtenu après HPLC (colonne Hypercarb, tampon d'élution Acide acétique 20 mM-5% CH_3CN). Suivi en U.V. à 240 nm. Le pic correspondant à la N-benzoyl-2-oxo-histidine est marqué d'une flèche.

Le produit élué à 10 minutes correspondant à la N-benzoyl-2-oxo-histidine est collecté. Afin d'obtenir la 2-oxo-histidine, une hydrolyse acide est réalisée pendant 15h à 105°C. Dans le but d'éviter une éventuelle dégradation du composé, une concentration élevée en dithiothréitol (DTT) a été ajoutée comme le préconisent Lewish et Levine (Lewisch & Levine, 1995). Le produit de l'hydrolyse est principalement la 2-oxo-histidine qui a été isolée par une nouvelle purification par HPLC (le produit est élué par un gradient d'acétonitrile). La calibration de cet échantillon a été réalisée à l'aide d'une solution de tétrahydrofurane (THF) de concentration connue par spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) en calculant le rapport des intégrales des massifs de proton de chaque composé.

2) Détection et quantification de la 2-oxo-histidine par HPLC-MS/MS

La méthode de détection de la 2-oxo-histidine, basée sur la technique HPLC-MS/MS, a été mise au point en collaboration avec Jean-Luc Ravanat du Laboratoire de Lésion des Acides Nucléiques (LAN-CEA Grenoble).

- *Principe de la technique HPLC-MS/MS :*

La technique de chromatographie liquide haute performance couplée à la détection par spectrométrie de masse en mode tandem (HPLC-MS/MS) a reçu un intérêt croissant au cours des dernières années. D'un point de vue pratique, les composés sont séparés sur une colonne chromatographique par une phase mobile liquide avant d'être directement introduits dans la source d'ionisation. L'ionisation s'effectue à pression atmosphérique par « electrospray » ou par ionisation chimique à pression atmosphérique. Dans le mode « electrospray », les ions sont produits par nébulisation de l'échantillon au sein d'un champ électrique élevé. Le mode d'ionisation utilisé lors de nos expériences est le mode « electrospray » associé à un mode positif qui permet d'ioniser les acides aminés par protonation. La détection peut être effectuée en mode SIM (« **S**electe**d** **I**on **M**onitoring ») ou en mode tandem MRM (« **M**ultiple **R**eaction **M**onitoring »). Dans ce dernier cas, trois quadripôles sont disposés en série (Figure V.3). Le premier permet de sélectionner un ion parent qui sera ensuite fragmenté dans le deuxième quadripôle encore appelé cellule de collision. L'ion caractéristique issu de cette fragmentation est ensuite sélectionné dans le troisième quadripôle avant d'être détecté. Ce mode d'analyse permet une mesure très spécifique : en effet, seuls les ions de valeur $m/z = F$ issus de la

fragmentation de l'ion parent de valeur $m/z = M$ sont quantifiés ; ainsi une transition = $M \rightarrow F$ sera utilisée pour la détection et non pas la seule masse M comme dans le mode « SIM ».

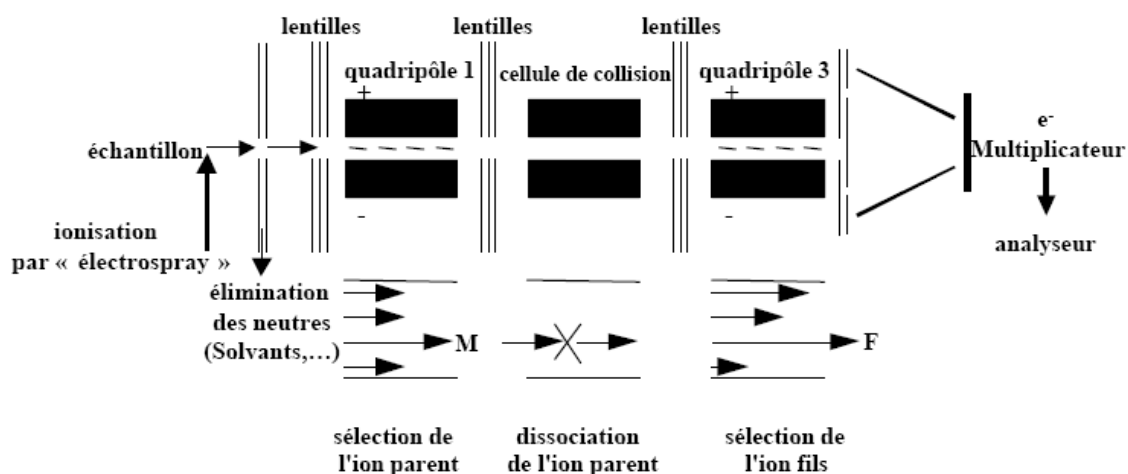


Figure V.3 : spectrométrie de masse en mode tandem.

La transition caractéristique utilisée pour le dosage de la 2-oxo-histidine est la transition issue de la fragmentation de l'ion parent $m/z = 172$ en l'ion fils $m/z = 126$ (Figure V.4). Cette transition (classiquement observée pour les acides aminés) correspond à la perte, par l'ion parent, d'un groupement carbonyle (CO) et d'une molécule d'eau (H_2O). De plus, la transition $156 \rightarrow 110$ a été utilisée pour détecter spécifiquement l'histidine afin de déterminer le taux relatif de 2-oxo-histidine (Piraud *et al.*, 2005).

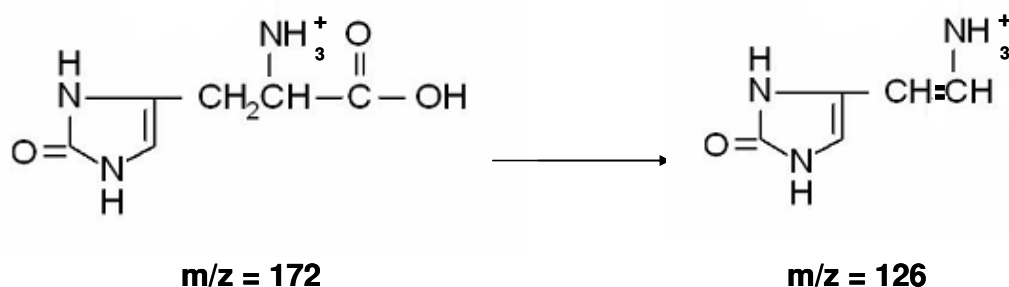


Figure V.4 : transition caractéristique utilisée pour le dosage de la 2-oxo-histidine.

Dans le cadre de la mise au point d'une méthode d'analyse HPLC-MS/MS, une optimisation des conditions de la séparation chromatographique est requise avec notamment le choix de la colonne et des tampons. Dans notre cas, une colonne HYPERCARB a été choisie. Le tampon de départ est une solution aqueuse à 0,1% acide trifluoroacétique (TFA) et le tampon d'élution correspond à un gradient en acétonitrile (CH₃CN). Différents paramètres du spectromètre de masse sont également optimisés de manière à obtenir une meilleure réponse après injection de l'échantillon (rapport signal/bruit faible). Pour cela, l'obtention d'un échantillon de 2-oxo-histidine pur est primordiale. Ceci permet, d'une part, de vérifier que la 2-oxo-histidine présente une bonne capacité à s'ioniser et permet, d'autre part, une calibration précise du spectromètre (calibration externe).

- *Détection de la 2-oxo-histidine :*

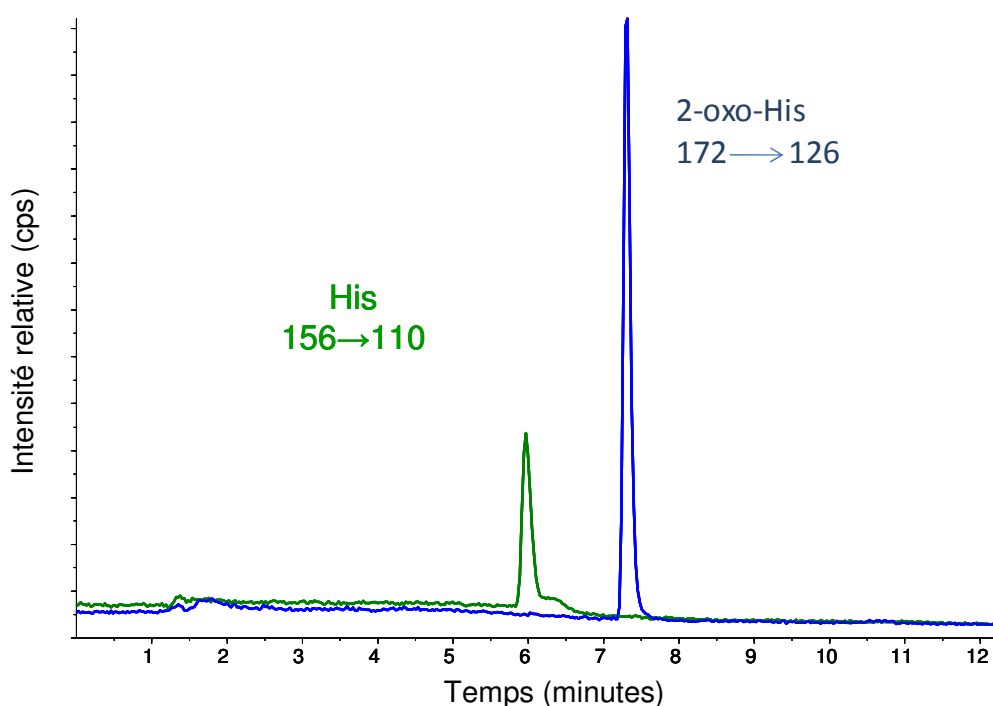


Figure V.5: chromatogramme obtenu par HPLC-MS/MS (colonne Hypercarb, tampon d'élution 0.1% TFA puis gradient en CH₃CN).

Le standard de 2-oxo-histidine a donc été analysé grâce à cette méthode. Un échantillon contenant à la fois l'histidine et son équivalent oxydé a été analysé afin de s'assurer que les conditions de séparation de ces deux acides aminés sont correctes. Le

chromatogramme obtenu est présenté sur la figure V.5. Cette méthode conduit à une bonne séparation entre l'histidine et la 2-oxo-histidine et permet de détecter jusqu'à une picomole d'acides aminés. Ces deux paramètres sont importants pour l'étude du mécanisme de la réaction de PerR avec H_2O_2 par cette technique.

L'étude de la réactivité de PerR vis-à-vis d' H_2O_2 nécessite de travailler avec la forme PerR-Zn-Fe. Cette forme est sensible à l'air, sa réactivité doit donc être étudiée en milieu anaérobie. Malheureusement à ce stade de notre travail, les premières expériences n'ont pas pu être réalisées. Cependant, l'analyse des différents lots de protéine oxydée (voir chapitre I) a donné des résultats intéressants qui sont détaillés dans le paragraphe suivant.

II. Dosage de la 2-oxo-histidine dans différents lots de protéine oxydée.

Dans le chapitre I des résultats, nous avons décrit l'oxydation de la protéine PerR (adduit +16 Da) lors de son expression et de sa purification. Des expériences de métallation par le manganèse suivies en RPE ont montré que cette forme oxydée de la protéine n'est pas capable de lier le métal et qu'elle est donc inactive. Des digestions trypsiques de la protéine analysées en spectrométrie de masse MALDI-TOF ont permis de localiser cette oxydation au sein de deux peptides contenant les résidus histidines 37, 91 et 93 qui sont potentiellement les ligands du métal de régulation (modèle de la forme active présenté dans le chapitre III des résultats). L'oxydation de PerR, pendant l'expression et la purification de la protéine, est également observée par le groupe de J.D. Helmann (Lee & Helmann, 2006). Ces auteurs indiquent que cette inactivation de PerR a très probablement lieu pendant la phase de purification selon un mécanisme de type Fenton.

La méthode de détection et de quantification que nous avons mise au point doit nous permettre de mieux caractériser la nature de l'oxydation de PerR. Préalablement à l'étude mécanistique, des lots de protéine présentant des pourcentages d'oxydation différents ont été analysés. En amont de l'analyse en HPLC-MS/MS, la protéine subit une hydrolyse acide permettant de rompre les liaisons peptidiques entre les résidus. Différents témoins ont été réalisés afin de s'assurer que cette hydrolyse n'entraîne pas une dégradation des acides aminés. Les résultats obtenus pour chaque échantillon ont permis de mettre en évidence la

présence de 2-oxo-histidine. Le taux de formation de cet acide aminé modifié a pu être déterminé à partir du standard de 2-oxo-histidine que nous avons synthétisé et quantifié.

La protéine PerR contient 10 résidus histidine. L'oxydation d'une seule de ces histidines en 2-oxo-histidine conduit donc à la forme oxydée de PerR. Pour une protéine oxydée à 100%, on a alors un taux correspondant de 2-oxo-histidine égal à 10%. Les résultats obtenus pour différents échantillons partiellement oxydés sont présentés sur la figure V.6.

Echantillon de protéine analysé	PerR ₁	PerR ₂	PerR ₃
Pourcentage de 2-oxo-histidine par rapport à l'histidine (mesuré en HPLC-MS/MS)	≈ 1%	≈ 3%	≈ 6%
Pourcentage de forme oxydée (estimée en spectrométrie de masse)	10%	30%	55%
Nombre d'équivalent de Mn ²⁺ incorporé par rapport à la protéine (suivi en RPE)	≈ 0,9 eq	≈ 0,6 eq	≈ 0,5 eq

Figure V.6: tableau présentant les résultats obtenus pour le dosage de la 2-oxo-histidine au sein de différents lots de protéine oxydée. Les résultats obtenus en spectrométrie de masse et en spectroscopie RPE pour chaque échantillon sont également reportés.

Ces analyses ont donc permis d'identifier formellement la 2-oxo-histidine comme le résidu associé à l'oxydation de PerR. En effet, les taux d'oxydation estimés en spectrométrie de masse correspondent bien aux taux de 2-oxo-histidine mesurés par HPLC-MS/MS.

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, l'analyse de l'incorporation du manganèse permet d'affirmer que sous cette forme oxydée la protéine n'est plus capable de lier son métal de régulation. L'ensemble de nos données nous permet d'affirmer plus précisément que c'est l'oxydation de l'histidine 37 et 91 et/ou 93 en 2-oxo-histidine qui en est responsable.

III. Conclusion et discussion.

La synthèse d'un standard de 2-oxo-histidine nous a permis de mettre au point une méthode basée sur la séparation chromatographique et l'analyse en spectrométrie de masse en mode tandem (HPLC-MS/MS) de détection et de quantification de cet acide aminé modifié. Cette méthode offre une sensibilité de l'ordre de la picomole.

Grâce à cette méthode, nous avons clairement identifié la 2-oxo-histidine comme le produit d'oxydation de la protéine PerR. Ce résultat a été obtenu à partir d'échantillons issus de différents lots de protéine présentant un taux d'oxydation variable (voir chapitre I). Comme l'indique J.D. Helmann, l'oxydation de la protéine, lors de son obtention, est très vraisemblablement le résultat de la réaction d' H_2O_2 avec le Fe^{2+} au niveau du site de régulation. En effet, nous avons montré, dans le chapitre I des résultats, qu'en se plaçant dans des conditions de culture où la concentration en fer est quasi-nulle, on obtient alors une protéine très peu oxydée. Ce travail nous a donc permis de démontrer clairement que la 2-oxo-histidine est le produit d'oxydation de la protéine PerR de *Bacillus subtilis* et qu'elle représente donc le « marqueur biologique » de l'inactivation de cette protéine.

PerR détecte le peroxyde d'hydrogène via une oxydation catalysée par le métal aboutissant à l'oxydation d'un ou plusieurs ligands histidine du métal de régulation en 2-oxo-histidine. Ce mécanisme original se différencie de la majorité des senseurs d' H_2O_2 caractérisés chez les procaryotes ou les eucaryotes où la formation d'un pont disulfure est souvent à l'origine de leur inactivation (Barford, 2004; Kiley & Storz, 2004; Toledano *et al.*, 2004). Ces senseurs peuvent alors être « ré-utilisés » par la cellule dans la mesure où la formation de ce pont disulfure est réversible. En ce qui concerne PerR, l'oxydation d'un résidu histidine en 2-oxo-histidine constitue, à ce jour, une modification irréversible. La protéine PerR serait donc « sacrifiée » après sa réaction avec H_2O_2 . Une fois oxydée, PerR est très probablement dégradée par la cellule comme c'est le cas, par exemple, de la glutamine synthétase. L'oxydation d'une histidine de cette enzyme en 2-oxo-histidine (Levine, 1981; Levine *et al.*, 1981) augmente la sensibilité de la protéine aux protéases telles que la subtilisine (Farber & Levine, 1982). Dans le cas de PerR, la protéase responsable de sa dégradation reste à déterminer.

Dans une perspective à court terme, le second objectif de ce travail est de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de détection d' H_2O_2 par PerR. Les premières études de réactivité de la protéine PerR-Zn-Fe avec H_2O_2 sont en cours. La mesure du taux de formation

de 2-oxo-histidine en fonction de différents agents oxydants (H_2O_2 , MCPBA, PhIO) ou en présence ou non de piègeurs de radicaux hydroxyles permettra de détailler plus précisément ce mécanisme réactionnel. Des réactions d'oxydation de PerR avec marquage isotopique ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$, H_2^{18}O) devraient également permettre d'aller dans ce sens et donc de déterminer si l'inactivation a lieu par production de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton ou par un transfert d'oxygène via une espèce métallique à haut degré d'oxydation.

Barford, D. (2004). The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struc Biol* **14**: 679-686.

Farber, J. M. & Levine, R. L. (1982). Oxidative modification of the glutamine-synthetase of *Escherichia-coli* enhances its susceptibility to proteolysis. *Fed Proc* **41**: 865-865.

Farquhar, E. R., Koehntop, K. D., Emerson, J. P. & Que, L. (2005). Post-translational self-hydroxylation: A probe for oxygen activation mechanisms in non-heme iron enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 230-239.

Gaballa, A. & Helmann, J. D. (2002). A peroxide-induced zinc uptake system plays an important role in protection against oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **45**: 997-1005.

Herbig, A. F. & Helmann, J. D. (2001). Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* **41**: 849-859.

Hoffart, L. M., Barr, E. W., Guyer, R. B., Bollinger, J. M. & Krebs, C. (2006). Direct spectroscopic detection of a C-H-cleaving high-spin Fe(IV) complex in a prolyl-4-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 14738-14743.

Kiley, P. J. & Storz, G. (2004). Exploiting thiol modifications. *PLoS Biol* **2**: 1714-1717.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006). The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* **440**: 363-367.

Levine, R. L. (1981). Oxidative modification of glutamine-synthetase is due to loss of one histidine residue. *Fed Proc* **40**: 1690-1690.

Levine, R. L., Oliver, C. N., Fulks, R. M. & Stadtman, E. R. (1981). Turnover of bacterial glutamine-synthetase - Oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 2120-2124.

Lewis, S. A. & Levine, R. L. (1995). Determination of 2-oxohistidine by amino-acid-analysis. *Anal Biochem* **231**: 440-446.

Piraud, M., Vianey-Saban, C., Petritis, K., Elfakir, C., Steghens, J. P. & Bouchu, D. (2005). Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**: 1587-1602.

Stadtman, E. R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins - Biochemical-mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* **9**: 315-325.

Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L. & Tacnet, F. (2004). Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* **29**: 351-357.

Traore, D. A. K., El Ghazouani, A., Ilango, S., Dupuy, J., Jacquamet, L., Ferrer, J. L., Caux-Thang, C., Duarte, V. & Latour, J. M. (2006). Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **61**: 1211-1219.

Uchida, K. & Kawakishi, S. (1993). 2-oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *Febs Lett* **332**: 208-210.

Uchida, K. & Kawakishi, S. (1994). Identification of oxidized histidine generated at the active-site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H₂O₂ - Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine-118. *J Biol Chem* **269**: 2405-2410.

Conclusion générale

Le peroxyde d'hydrogène est un produit de la respiration aérobie qui résulte de la réduction incomplète du dioxygène. En tant que précurseur du radical hydroxyle via la réaction de Fenton, H_2O_2 est néfaste pour les cellules. Celles-ci disposent donc d'une machinerie enzymatique capable de le détruire (catalases, peroxydases) ou de détruire ses dérivés (alkylhydroperoxyde réductases). Dans les conditions normales de croissance, ces enzymes sont maintenues à un niveau basal. En situation de stress peroxydique, ce niveau est insuffisant et la synthèse des enzymes de défense doit être activée. Les gènes codant pour ces enzymes sont placés sous le contrôle d'un répresseur lié à l'ADN qui bloque l'étape de transcription. Ce répresseur est un senseur de H_2O_2 et sous son action il libère l'accès de l'ARN polymérase qui permet la synthèse des enzymes de défense.

Chez *Bacillus subtilis*, la métalloprotéine PerR est le régulateur clé de la réponse cellulaire au peroxyde d'hydrogène. Elle contrôle la synthèse d'une catalase, une alkylhydroperoxyde réductase, une protéine de protection de l'ADN et un transporteur du zinc. PerR a été décrite comme une protéine « Fur-like » possédant un site à zinc et un site de régulation occupé par Mn^{2+} ou Fe^{2+} . Les gènes activés, et donc la synthèse des protéines dépendent de la nature du métal présent dans le site d'activation.

PerR de *B. subtilis* constitue l'homologue d'OxyR d'*E. coli* dont la caractérisation et le mode de réactivité ont été très étudiés. Chacun de ces senseurs est présent dans un organisme où l'autre est absent. Au début de cette thèse, les travaux rapportés dans la littérature sur la protéine PerR étaient essentiellement des études de génétique et de microbiologie. Le mécanisme d'action de PerR n'était pas connu. Dans ce contexte, l'étude de cette protéine du point de vue de sa métallation, de son interaction avec l'ADN et de sa réactivité avec H_2O_2 était donc un défi intéressant à relever.

Ce travail a permis d'obtenir la protéine PerR de *B. subtilis* sous forme de dimère apo-PerR-Zn. Le protocole initialement décrit par J.D. Helmann a été modifié afin d'obtenir une protéine non oxydée. En effet, ce premier protocole aboutit à la présence de deux formes de la protéine avec des pourcentages aléatoires : la forme native et une forme oxydée présentant un adduit de 16 Da. Cette oxydation est vraisemblablement le résultat de la réaction de PerR-Zn-Fe avec H_2O_2 via son mécanisme de détection. En contrôlant l'apport en fer (milieu minimum, chélateur du Fe^{3+} pendant la culture, et chélateur de Fe^{2+} pendant la purification), nous sommes parvenus à obtenir, de manière reproductible, une protéine très majoritairement réduite. En éliminant toute trace de fer disponible pour la protéine, on l'empêche ainsi de

réagir avec H_2O_2 et donc de « s'auto-oxyder ». La mise au point de ce protocole était cruciale pour obtenir des données biochimiques précises telles que les constantes d'affinité PerR-Métal et PerR-ADN. Grâce à la spectroscopie RPE, nous avons pu évaluer l'affinité de la protéine PerR pour le Mn^{2+} . Cette technique nous a permis de déterminer la valeur de la constante de dissociation (K_d) PerR- Mn^{2+} en tenant compte du pourcentage d'oxydation de l'échantillon même dans le cas où celui-ci est relativement faible. Ce K_d est égal à environ 0,7 μM . La technique du retard sur gel a permis d'évaluer l'activité de la protéine, c'est-à-dire sa capacité à fixer sa séquence de reconnaissance sur l'ADN. Les expériences ont montré que la fixation de PerR à l'ADN est dépendante du métal de régulation (ici le Mn^{2+}) et ont permis de déterminer un K_d de la protéine pour l'ADN égal à 15 nM.

La structure cristallographique de la protéine apo-PerR-Zn avec une résolution de 1.7 Å a été obtenue au laboratoire en collaboration avec le groupe Synchrotron du LCCP (Laboratoire de Cristallographie et Cristallogénèse des Protéines) de l'IBS. Cette structure a permis de mettre en évidence que les quatre cystéines de chaque monomère sont impliquées dans la coordination d'un atome de zinc, conduisant ainsi à un site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$. Ce site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ est localisé au niveau du domaine C-terminal ; il est composé par les cystéines 96, 99, 136 et 139 présentes sous forme de double motif CX_2C . En maintenant les interactions entre les domaines de dimérisation de chaque monomère, ce site joue un rôle structural en favorisant ainsi la stabilité du dimère. Ces données structurales ont été confirmées par des études de réactivité. Des expériences de titrage au DTNB (qui réagit avec les fonctions thiols) ont montré que l'oxydation des résidus cystéines (par le peroxyde d'hydrogène ou par un oxydant spécifique des fonctions thiols, le diamide) conduit à la formation de deux ponts disulfure intramoléculaires. Cette oxydation entraîne le relargage du zinc (confirmé en absorption atomique). L'oxydation des cystéines et donc la perte du zinc conduisent alors à la dissociation du dimère qui passe sous la forme monomère. Chez la majorité des senseurs d' H_2O_2 caractérisés chez les procaryotes ou les eucaryotes, la formation d'un pont disulfure est à l'origine de leur inactivation (Barford, 2004; Kiley & Storz, 2004; Toledano *et al.*, 2004). Cependant, dans le cas de PerR, en présence de concentrations élevées en espèces oxydantes (de l'ordre de 100 équivalents par rapport à la protéine), la cinétique d'oxydation des cystéines est trop lente pour rendre compte de la réactivité vis-à-vis d' H_2O_2 . En effet, la constante de vitesse est égale, dans le cas de PerR, à 4.10^{-3} s^{-1} . L'ensemble des données cristallographiques et biochimiques nous a donc permis de mettre en évidence la présence d'un site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ dont le rôle est essentiellement structural.

A partir de la structure cristallographique de l'apo-protéine PerR-Zn (forme inactive), nous avons proposé un modèle de la forme active. Dans ce modèle, la protéine adopte une conformation en forme de « pince » capable d'interagir avec l'ADN. La fixation du métal régulateur permettrait d'obtenir et de stabiliser cette conformation. Nous avons réalisé l'étude des changements structuraux de la protéine en solution, lors de la métallation en absence ou en présence d'ADN, grâce à la spectroscopie de fluorescence. Parmi les mutants synthétisés pour cette étude (la protéine sauvage ne contient pas de tryptophane permettant de suivre des modifications dans l'émission de fluorescence), le mutant PerR-Y77W a joué un véritable rôle de sonde structurale. En effet, la métallation de ce mutant entraîne une baisse de l'intensité de fluorescence. Le résidu W77, qui se trouve au sein d'une boucle flexible de la protéine, voit donc son environnement modifié lors du passage de la forme inactive à la forme active de PerR. Ce résultat, cohérent avec nos hypothèses structurales, va dans le sens d'un réarrangement conformationnel de la protéine en solution. Le comportement du mutant PerR-Y77W, en présence d'ADN, est également intéressant. En effet, lors de la formation du complexe ADN-protéine, l'environnement du résidu W77 est également perturbé (augmentation de l'intensité de fluorescence). L'ensemble des résultats obtenus suggère que, *in vitro*, la protéine PerR peut exister sous trois formes : la forme apo PerR-Zn, la forme métallée « libre » PerR-Zn-M et la forme métallée complexée à l'ADN.

Nous nous sommes également intéressés au mode d'interaction de la protéine PerR avec l'ADN. Deux approches complémentaires (bases modifiées de l'ADN et mutations de la protéine) ont été mises en œuvre pour étudier les bases de la spécificité démontrées par le groupe de J.D. Helmann (Fuangthong & Helmann, 2003). Les expériences de mutagenèse dirigée ont mis en évidence un certain nombre d'acides aminés dont les chaînes latérales sont très probablement impliquées dans la formation du complexe ADN-PerR : la tyrosine 60, l'asparagine 61 et l'arginine 64. D'autre part, les expériences de retard sur gel ont permis de montrer que les bases en position 2 (thymine) et 3 (adénine) de la séquence d'ADN sont essentielles dans l'interaction avec PerR.

En parallèle de nos travaux, le groupe de J.D. Helmann a proposé un mécanisme original de détection d'H₂O₂ par PerR. En réalisant des expériences de réactivité avec du peroxyde d'hydrogène enrichi isotopiquement et après analyse en spectrométrie de masse, les auteurs ont proposé, qu'en présence de H₂O₂, la réaction localisée sur le métal de régulation (Fe²⁺) entraînait l'oxydation des résidus histidines supposées lier le Fe²⁺ (Lee & Helmann, 2006). Cette oxydation irréversible entraîne la perte du métal et la dissociation du complexe ADN-protéine. Selon ces auteurs, H₂O₂ réagit avec le Fe²⁺ selon une réaction de type Fenton

conduisant à la formation du radical hydroxyle OH \cdot . Ce radical oxyde ensuite sélectivement une ou deux histidines du site actif en 2-oxohistidine. Lors de la purification de la protéine, nous avons obtenu une forme oxydée présentant un adduit de 16 Da par rapport à la forme native. Nous avons montré que cette oxydation est directement reliée au taux de fer disponible pendant la culture cellulaire. De plus, le groupe de J.D. Helmann observe également cette oxydation de PerR lors de son obtention. Toutes ces données suggèrent, comme le propose J.D. Helmann, que l'oxydation de PerR est très vraisemblablement le résultat de la réaction d'H₂O₂ avec le Fe²⁺ au niveau du site de régulation. La mise au point d'une méthode basée sur une séparation chromatographique puis une analyse en spectrométrie de masse en mode tandem (HPLC-MS/MS) nous a permis d'identifier, clairement et pour la première fois, la 2-oxo-histidine comme le produit d'oxydation de la protéine PerR. La 2-oxo-histidine constitue donc le « marqueur biologique » de l'inactivation de PerR. Cette modification apparaît, à ce jour, irréversible. La protéine serait ainsi « sacrifiée » après sa réaction avec H₂O₂. Sa voie de dégradation reste cependant à déterminer.

En perspective à ce travail, la méthode de détection et de quantification de la 2-oxo-histidine peut permettre de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de détection d'H₂O₂ par PerR. En effet, nous avons vu que J.D. Helmann propose une réaction de type Fenton entre H₂O₂ et le Fe²⁺ conduisant à la génération de radicaux hydroxyles qui vont oxyder un ou deux résidus histidine du site de régulation. Cependant, la nature de l'espèce oxydante n'a pas été clairement démontrée. La mesure du taux de formation de 2-oxo-histidine en fonction de différents agents oxydants (H₂O₂, MCPBA, PhIO) ou en présence ou non de piègeurs de radicaux hydroxyles ainsi que des réactions d'oxydation de PerR avec marquage isotopique (H₂¹⁸O₂, H₂¹⁸O) devraient permettre de déterminer si l'inactivation a lieu par production de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton ou par un transfert d'oxygène via une espèce métallique à haut degré d'oxydation. Comme dans le cas des dioxygénases α -KG dépendantes, l'utilisation de techniques de cinétique rapide, telles que le « stopped-flow » et le « rapid-mix freeze-quench » couplés à la spectroscopie Mössbauer, pourra permettre de mettre en évidence les intermédiaires réactionnels et donc une meilleure compréhension du mécanisme de détection d'H₂O₂ par PerR.

En parallèle de ces études mécanistiques, l'étude du mode d'interaction PerR-ADN mérite également d'être poursuivie. Il serait intéressant, par exemple, de déterminer la stoechiométrie du complexe ADN-PerR et de tenter, par de nouvelles mutations de la

protéine, de déterminer les points de contacts entre la protéine et sa séquence de reconnaissance.

La sonde structurale que constitue le mutant PerR-Y77W pourra être utilisée pour suivre le comportement de la protéine liée à l'ADN après réaction avec H₂O₂. La dissociation PerR-ADN qui résulte de cette réaction entraîne certainement un changement de conformation de la protéine. La modification de l'environnement du résidu W77 permettra de suivre la dissociation par spectroscopie de fluorescence. La cinétique d'oxydation de la protéine au niveau de son site de régulation ainsi que la cinétique de décrochage de l'ADN pourront donc être déterminées. Dans ce cas, les expériences de réactivité du mutant PerR-Y77W avec H₂O₂ seront réalisées avec la forme PerR-Zn-Fe en conditions strictes d'anaérobiose.

En parallèle de ces travaux de biochimie, des essais de cristallogénèse sur la forme active PerR-Zn-M (M= Mn²⁺ ou Fe²⁺) et sur le complexe PerR-Zn-Mn²⁺/ADN seront également réalisés.

Barford, D. (2004). The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 679-686.

Fuangthong, M. & Helmann, J. D. (2003). Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 6348-6357.

Kiley, P. J. & Storz, G. (2004). Exploiting thiol modifications. *PLoS Biol* **2**: 1714-1717.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006). The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* **440**: 363-367.

Toledano, M. B., Delaunay, A., Monceau, L. & Tacnet, F. (2004). Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* **29**: 351-357.

Matériels et méthodes

I. Obtention et caractérisation de la protéine.

1) Construction des plasmides

a. Le gène *perr* :

Le gène *perr* de *B. subtilis* a été inséré dans un plasmide pET30c (Novagen) entre les sites de restriction de *NdeI* et *XhoI*. Le gène a été amplifié par PCR à partir des deux oligonucléotides présentés figure M1 avec l'ADN polymérase PfuTurbo (Stratagene). Le premier oligonucléotide (1) comporte le site *NdeI* (CAT ATG) et le second (2) le site *XhoI* (CTC GAG).

- (1) 5'-GAGAGGTGCATGAC**CATATG**GCTGCACATGAAC
- (2) 5'-GAGAGCCGCTGACT**CGAG**ATAAGGGATTAGAAGG

Figure M1 : oligonucléotides utilisés pour l'amplification du gène *perr*.

Le produit de PCR est digéré par les enzymes *NdeI* (Fermentas) et *XhoI* (Amersham Biosciences) puis purifié sur gel d'agarose et inséré par ligation dans le plasmide pET30c. Ce nouveau plasmide, appelé pET30c-PerR, contient le gène *perr* sous contrôle d'un promoteur reconnu par l'ARN polymérase T7. A ce stade, la partie du plasmide contenant le gène *perr* est vérifiée par séquençage de l'ADN double brin. Ce plasmide est ensuite introduit par choc thermique dans une souche BL21(DE3) d'*E. coli* qui synthétise l'ARN polymérase sous contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. Ce plasmide contient également le gène de résistance à la kanamycine.

b. Mutagenèse dirigée :

Sept mutants ont été synthétisés : les mutants PerR-Y44W et PerR-Y77W dont les tyrosines en position 44 et 77 ont été mutées en tryptophane, les mutants PerR-R64G et PerR-R67G dont les arginines en position 64 et 67 ont été mutées en glycine, le mutant PerR-Y60G dont la tyrosine en position 60 a été mutée en glycine, le mutant PerR-N61G dont l'asparagine en position 61 a été mutée en glycine, et le mutant PerR-E68G dont l'acide glutamique en

position 68 a été muté en glycine. Les mutations sont introduites dans le gène *perr* par amplification du plasmide parental amorcée par des oligonucléotides portant la mutation en utilisant le « Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit » (Stratagene). Les oligonucléotides amorces sont complémentaires de chaque brin du gène *perr* dans la zone à muter sauf pour la ou les bases modifiées (Figure M2). Ils sont construits à partir du ou des codons modifiés en ajoutant de part et d'autre les bases complémentaires de la séquence du gène. La taille détermine l'affinité de l'oligonucléotide pour la séquence. La stabilité du duplex d'ADN est reflétée par le calcul de la température de demi-dénaturation (T_m) :

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N$$

où %GC est le pourcentage de base G+C et N est le nombre total de bases de l'oligonucléotide moins le nombre de bases remplacées. La valeur de T_m doit être supérieure à la température de fonctionnement de l'ADN polymérase d'au moins 10°C. Nous avons utilisé la PfuUltra (Stratagene) dont l'activité est optimale à 68°C. Nous avons donc ajouté un nombre de bases suffisant pour obtenir un T_m supérieur à 78°C (Figure M2). La synthèse des oligonucléotides a été réalisée à façon par Sigma Genosys.

PerR-Y60G : $T_m \approx 84^\circ\text{C}$

5'-CATGAGCGTAGCGACGGTA**GG**TAACAATTTGCGTGTGTTTC
5'-GAACACACGCAAATTGTTA**CC**TACCGTCGCTACGCTCATG

PerR-N61G : $T_m \approx 83^\circ\text{C}$

5'-GCGTAGCGACGGTATAT**GG**CAATTTGCGTGTGTTCC
5'-GGAACACACGCAAATTG**CC**ATATACCGTCGCTACGC

PerR-R64G : $T_m \approx 81,5^\circ\text{C}$

5'-CGGTATATATAACAATTTG**GG**TGTGTTCCGGGAATCAGG
5'-CCTGATTCCCGGAACACAC**CC**CAAATTGTTATATATACCG

PerR-R67G : $T_m \approx 80^\circ\text{C}$

5'-CAATTTGCGTGTGTT**CG**GGGAATCAGGTTTGG
5'-CCAAACCTGATTCC**CG**GAACACACGCAAATTG

PerR-E68G : $T_m \approx 81,5^\circ\text{C}$

5'-GGGTGTGTTCCGGG**G**ATCAGGTTTGGTAAAG
5'-CTTTTACCAAACCTGAT**CCC**CGGAACACACCC

PerR-Y44W : $T_m \approx 82,5^\circ\text{C}$

5'-CAACAGCGGACGATATAT**GG**AAAGCTCTGGAAGGGAAAT
5'-ATTTCCCTTCCAGAGCTTT**CC**ATATATCGTCCGCTGTTG

PerR-Y77W : $T_m \approx 83^\circ\text{C}$

5'-GGTAAAAGAGCTCACAT**GGG**GTGATGCTTCCAGCAG
5'-CTGCTGGAAGCATCACC**CC**ATGTGAGCTCTTTTACC

Figure M2 : amorces de PCR utilisées pour la réalisation des différents mutants. Les amorces de la même ligne du tableau sont complémentaires et contiennent la (ou les) mutation(s) ponctuelle(s) introduite(s) (en rouge).

Le mélange de PCR est composé du plasmide parental à 0,5 ng/μL, des oligonucléotides à 2,5 ng/μL chacun, des quatre dNTP (Fermentas) à 240 μM chacun, de 2,5

unités de PfuUltra (Stratagene) dans 50 µL de tampon Tris/HCl 20 mM pH 8,8 contenant 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% triton X-100 et 1 mg/mL de BSA. L'amplification a été réalisée au cours de 16 cycles de PCR composés chacun de trois étapes : une première étape de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes suivie d'une étape d'hybridation à 55°C pendant 1 minute et enfin une dernière étape d'élongation par l'ADN polymérase à 68°C pendant 6 minutes.

La ligation des extrémités 5' (correspondant à l'oligonucléotide de départ) et 3' (provenant de la répllication du reste du plasmide) a été réalisée dans la souche XL1 Blue d'*E. coli* (Stratagene) qui exprime les enzymes de réparation. Le mélange en fin de PCR contient le plasmide parental qui doit être éliminé. Celui-ci provenant d'une surproduction bactérienne, il est sélectivement digéré par l'enzyme de restriction DpnI qui ne reconnaît que l'ADN méthylé. La digestion est réalisée, pendant 1 heure à 37°C par ajout de 10 unités d'enzyme DpnI (Stratagene) au mélange PCR. 5 µL de produit digéré sont alors utilisés pour transformer 50 µL de bactéries XL1 Blue super compétentes. Les bactéries sont étalées sur milieu solide (LB + agar) contenant de la kanamycine à 50 µg/mL et laissées à incuber une nuit à 37°C. A partir d'une colonie obtenue, 100 mL de milieu LB contenant de la kanamycine à 50 µg/mL sontensemencés et laissés à incuber une nuit à 37°C sous agitation. Le plasmide est alors extrait et purifié à l'aide du kit Miniprep (Promega). Le gène *perr* est ensuite séquencé en double brin (Genome Express) afin de confirmer la présence de la mutation désirée.

2) Conditions de surexpression

a. La culture en milieu LB :

Les colonies de bactéries sont obtenues sur milieu solide (LB + agar + kanamycine à 50 µg/mL) à 37°C. Une colonie est prélevée et inoculée dans 25 mL de milieu LB contenant de la kanamycine à 50 µg/mL. Cette pré-culture est placée sur la nuit à 37°C sous agitation. Elle est ensuite ajoutée à 1 L de milieu LB (contenant de la kanamycine à 50 µg/mL) qui est placé à 37°C sous agitation. Lorsque l'absorbance à 600 nm atteint une valeur comprise entre 0,5 et 0,6, l'IPTG est ajouté à une concentration finale de 0,5 mM. La synthèse de PerR est alors réalisée pendant 3h à 37°C.

b. La culture en milieu minimum :

Dans le but de contrôler la concentration en fer disponible dans le milieu (voir chapitre I de la partie résultats), la culture est réalisée en milieu minimum (milieu M9). La figure M3 présente la composition de ce milieu modifié : il ne contient pas de fer et la desferrioxamine a été ajoutée à une concentration finale de 5 μM . Une colonie obtenue sur milieu solide (LB + agar + kanamycine 50 $\mu\text{g/mL}$) est prélevée et inoculée dans 10 mL de milieu LB contenant de la kanamycine à 50 $\mu\text{g/mL}$ sur la journée. Les cellules sont alors centrifugées à 2500 g pendant 5 minutes puis reprises dans 100 mL de milieu M9 contenant de la kanamycine à 50 $\mu\text{g/mL}$. La culture se poursuit sur la nuit à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 2500 g pendant 5 minutes puis reprises dans 1 L de milieu M9 contenant de la kanamycine à 50 $\mu\text{g/mL}$. A ce stade, la DO à 600 nm est d'environ 0,1. Ce litre de culture est placé à 37°C sous agitation. La synthèse de PerR est induite pendant 3h à 37°C par 0,5 mM IPTG lorsque l'absorbance à 600 nm atteint une valeur comprise entre 0,5 et 0,6.

	Concentration finale	* Composition en sels
Sels*		KH_2PO_4 3 g/L
Glucose	4 g/L	$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L
MgSO_4	1 mM	NaCl 0,5 g/L
CaCl_2	0,1 mM	NH_4Cl 1 g/L
MnCl_2	0,1 mM	** Composition en vitamines (pour 50 mL de solution)
ZnSO_4	50 μM	Pyridoxine 25 mg Chlorure de choline 25 mg
Desferrioxamine	5 μM	Biotine 25 mg Niacineamide 25 mg
Kanamycine	50 mg/L	Panthothenate 25 mg Riboflavine 2,5 mg
Vitamines**	2 mL / litre	Acide folique 25 mg Thiamine 125 mg

Figure M3 : composition du milieu M9 modifié.

3) *Extraction et purification de PerR*

Par souci de clarté, les conditions d'extraction et de purification détaillées dans la suite de cette partie sont celles utilisées après une culture en milieu minimum, c'est-à-dire dans les conditions où on obtient de manière reproductible une protéine majoritairement réduite.

a. Obtention des extraits protéiques :

Le litre de culture contenant les bactéries en solution est centrifugé à 7000 g pendant 10 minutes à 6°C. Le culot obtenu est solubilisé dans 30 mL de tampon Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 20 mM, Desferrioxamine 1 mM. La suspension bactérienne est alors soniquée 5 fois 30 secondes et les membranes des bactéries sont retirées par centrifugation à 35000 g pendant 30 minutes. Le surnageant obtenu est prêt à être chargé sur la colonne échangeuse d'anions.

b. Passage sur la colonne échangeuse d'anions :

La colonne échangeuse d'anions est une colonne du type Q-sepharose (Amersham Biosciences) connectée à un système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) et maintenue à 4°C. La colonne est préalablement équilibrée. Le mélange protéique est injecté à un débit de 2 mL/min (injection de 30 mL). La colonne est « rincée » par 100 mL de tampon Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 20 mM, EDTA 10 mM. La protéine est alors éluée avec un gradient linéaire de tampon Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 1 M, EDTA 10 mM. Les fractions contenant la protéine (correspondant à un pourcentage en tampon de haute force ionique compris entre 20 et 30 %) sont réunies. La solution protéique est alors précipitée pendant 15 heures sous agitation à 4°C en présence de sulfate d'ammonium à 80 % de saturation. Le précipité obtenu est alors récupéré par centrifugation à 25000 g pendant 45 minutes et dissous dans 4 mL de tampon Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 250 mM préalablement traité par une résine Chelex-100 (50 g de résine est ajouté à 1 L de tampon sous agitation douce pendant 1 heure à 4°C puis la solution est filtrée).

c. Passage sur la colonne de filtration sur gel :

La colonne superdex 75 HR 16/60 (Amersham Biosciences) est maintenue à 4°C et préalablement équilibrée avec le tampon Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 250 mM traité Chelex-100. Le volume du mélange protéique injecté est égal à 4 mL avec un débit d'environ 1 mL/min pour obtenir une bonne séparation des différentes espèces. La protéine PerR pure

est majoritairement présente sous forme de dimère. La pureté de la protéine est contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15 % en conditions dénaturantes. La concentration de la protéine, exprimée en monomère de PerR, est déterminée par mesure de l'absorbance à 277 nm en utilisant un coefficient d'absorption égal à $9020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4) *Analyse des métaux*

Préalablement à l'analyse, les échantillons subissent un changement de tampon réalisé sur colonne de type NAP-5 (Amersham Biosciences). Le tampon de l'analyse est un tampon Tris/HCl 100 mM pH 8 traité Chelex-100. La quantité de métaux est obtenue par analyse en spectrométrie d'absorption atomique (SAA). Cette technique est basée sur le principe que les atomes libres peuvent absorber la lumière d'une certaine longueur d'onde. L'absorption de chaque élément est spécifique. La détermination spectroscopique d'espèces atomiques peut seulement être réalisée à partir d'un échantillon à l'état gazeux, état dans lequel les atomes sont nettement séparés les uns des autres. Le zinc présent dans les échantillons de protéine est dosé par SAA de flamme sur un appareil de type Perkin Elmer 560 Norwalk. La chaleur nécessaire pour faire passer l'échantillon à l'état gazeux est générée par une flamme. Le fer et le manganèse sont dosés par SAA de four de graphite. Dans ce cas, l'atomisation de l'échantillon est réalisée dans un four de graphite par un atomiseur électrothermique. Ces analyses ont été effectuées au Département de Biologie Intégrée du Centre Hospitalier Universitaire de La Tronche.

5) *Spectrométrie de masse*

Les analyses en spectrométrie de masse ESI-TOF ont été réalisées au Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines, IBS Grenoble et au Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, CEA Grenoble pour les analyses MALDI-TOF.

a. ESI-TOF :

Cette méthode a été choisie pour vérifier le poids moléculaire de la protéine purifiée ainsi que ses modifications éventuelles. La protéine est directement analysée dans le tampon

Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 250 mM traité Chelex-100. Sa concentration est de l'ordre de 40 μ M. Les manipulations ont été effectuées sur un spectromètre de masse de la marque Micromass, UK.

b. MALDI-TOF :

Cette méthode a été choisie pour déterminer la localisation de l'oxydation de la protéine. La protéine, à une concentration de l'ordre de 25 μ M dans un tampon bicarbonate d'ammonium à 25 mM (pH 8), a été digérée par la trypsine (rapport masse de l'enzyme sur masse de la protéine égal à 4 %) pendant 18 heures. Un volume de 1 μ L d'échantillon est déposé sur la cible puis mélangé à 1 μ L de matrice. La matrice est l'acide 2,5-dihydrobenzoïque, en solution dans un mélange eau/acétonitrile (50/50), acide trifluoroacétique 0,1 %. Les spectres ont été obtenus avec un appareil MALDI-TOF voyager Elite (Perspective).

6) *Incorporation du métal suivie en RPE*

L'incorporation du manganèse est suivie par RPE à température ambiante. Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre Bruker EMX. 10 μ L d'une solution aqueuse de $MnCl_2$ à la concentration voulue sont ajoutés à 20 μ L d'une solution d'apoprotéine PerR-Zn à 150 μ M (tampon Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 250 mM traité Chelex-100). Le mélange est incubé 10 minutes à 21°C puis placé dans un capillaire qu'on place ensuite à l'intérieur du tube RPE. L'évaluation de la quantité de manganèse libre dans les échantillons de protéine est effectuée par comparaison de la hauteur de la 1^{ère} raie du signal avec celle de solutions standard de $MnCl_2$ dans les mêmes conditions de tampon.

7) *Activité de la protéine vérifiée par gel retard*

a. Marquage et hybridation de l'ADN cible :

La réaction de marquage est réalisée en présence de 1 pmol d'un des deux oligonucléotides simple brin, 2 μ L d'ATP- γ -³²P et 3 unités de T4 polynucléotide kinase

(Sigma-aldrich) pendant 30 minutes à 37°C. Le tampon de la réaction est composé de Tris/HCl 40 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, 5 mM DTT. L'excès de radioactivité est ensuite éliminé par purification sur colonne microspin G25 (Amersham biosciences).

1,5 équivalents de l'oligonucléotide complémentaire non marqué sont alors ajoutés dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, 5 % glycérol, 0,1 % triton. Le mélange comprenant 20 nM du brin marqué et 30 nM du brin complémentaire est chauffé à 90°C pendant 15 minutes. Cette étape de chauffage permet d'éviter les interactions non spécifiques entre les deux brins. La température est ensuite diminuée de manière progressive jusqu'à 25°C. Après 2 heures à 25°C, le mélange est placé pendant une nuit à 4°C. La formation du duplex est ensuite vérifiée sur gel de polyacrylamide non dénaturant.

b. Interaction avec l'ADN : expériences de retard sur gel.

La protéine PerR (0 à 5000 équivalents par rapport à l'ADN) est incubée en présence de 0,2 nM d'ADN double brin contenant la séquence de reconnaissance du promoteur du gène *mrgA* et de 10 µM d'ADN non spécifique (poly-dIdC). Le tampon de fixation est composé de Tris/HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,05% triton, 5% glycérol, et 100 µM MnCl₂. Le mélange réactionnel est incubé 15 minutes à 25°C. Le dépôt sur gel de polyacrylamide 15 % Tris acétate 40 mM pH 8,5 se fait après ajout de 4 µL de tampon de dépôt. La migration a lieu pendant 1 heure à 200V à 4°C dans un tampon Tris acétate 40 mM pH 8,5 en présence de 100 µM de MnCl₂. Le gel est ensuite exposé pendant quelques heures en présence d'un film (Phosphor screen Biorad). Ce film est alors analysé avec un PhosphorImager (Biorad) en utilisant le logiciel Quantity One.

II. Structure cristallographique et étude du site à zinc.

La partie « Experimental procedures » de l'article « Crystal Structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis* », paru dans la revue Molecular Microbiology, présenté dans le chapitre II des résultats, décrit les protocoles expérimentaux mis en œuvre pour l'obtention de la structure cristallographique de la protéine apo PerR-Zn et l'étude de la réactivité du site à zinc.

III. Changements structuraux en solution.

1) *Analyse des mutants par dichroïsme circulaire (CD)*

Les expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur un spectrophotomètre JASCO J-810 à 21°C. Les spectres ont été enregistrés dans l'UV-lointain (190-250 nm) dans des cuves de 300 µL et de 1 mm de chemin optique et dans l'UV-proche (250-320 nm) dans des cuves de 1 mL et de 1 mm de chemin optique. Les mesures sont réalisées dans un tampon Tris/HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, DTT 1 mM. La concentration en sels a été diminuée par rapport aux autres expériences car les sels absorbent aux environs de 200 nm et interfèrent avec le signal.

Les conditions expérimentales de l'appareil sont les suivantes : bande passante = 4 nm ; pas = 0,5 nm ; vitesse = 100 nm.min⁻¹ ; réponse du détecteur = 2 s. Dix scans par expérience sont enregistrés et moyennés pour obtenir le spectre final. Les spectres de la protéine PerR sauvage et des mutants PerR-Y44W et PerR-Y77W à une concentration de 20 µM sont enregistrés après 15 minutes d'équilibration dans la cuve.

2) *Spectroscopie de fluorescence*

Les expériences ont été réalisées sur un fluorimètre Perkin-Elmer LB 50 dans des cuves de 3 mL contenant 2 mL de solution. Les expériences sont réalisées sous agitation douce et à 25°C. Le tampon utilisé est le tampon Tris/HCl 100 mM pH 8, NaCl 250 mM traité Chelex-100.

Lors du titrage en métal, la concentration en protéine est égale à 500 nM. En présence d'ADN cible, la concentration en protéine est égale à 100 nM. A 2 mL de solution protéique, sont ajoutés successivement 2 µL de MnCl₂ à la concentration désirée (de 0 à 2000 équivalents en absence d'ADN ; et de 0 à 1000 équivalents en présence de 100 nM ADN). Après chaque ajout, la mesure est réalisée après 10 minutes d'incubation.

Les paramètres d'enregistrement sont les suivants : longueur d'onde d'excitation λ_{exc} = 295 nm, bande passante d'excitation = 5 nm, longueur d'onde d'émission mesurée de 270 à 500 nm, bande passante d'émission = 20 nm.

IV. Interactions ADN-PerR.

1) Synthèse des oligonucléotides modifiés

Les séquences d'ADN utilisées pour les réactions de pontage ADN-PerR et pour les expériences de retard sur gel (Figure IV.6 du chapitre IV des résultats) sont synthétisées par la voie des phosphoramidites. Ces oligonucléotides correspondent à la séquence du promoteur du gène *mrgA* où une adénine (en position 3, 5 ou 12) est substituée par une 8-oxoadénine (8-oxoA). Un oligonucléotide contenant une 8-oxoguanine (8-oxoG) en position 2 à la place d'une thymine a également été synthétisé. Les synthons 8-oxoA et 8-oxoG sont obtenus commercialement (Glen Research USA). Les oligonucléotides obtenus sont purifiés après déprotection par HPLC et analysés en spectrométrie de masse (MALDI-TOF).

2) Marquage et hybridation de l'ADN

Le marquage de l'ADN est réalisé comme décrit précédemment. Par contre, le mélange réactionnel pour le protocole d'hybridation diffère. Ce mélange comporte 475 nM d'un premier non marqué, 1,65 nM de ce même brin marqué et 750 nM de brin complémentaire. Seule une petite quantité de brin marqué suffit à visualiser la migration de l'ADN (ponté ou non avec la protéine) après sa migration sur gel. La suite du protocole d'hybridation est identique à celui décrit au paragraphe I.7.a.

3) Réaction de pontage

La protéine PerR (4 μ M et 47 μ M) est incubée pendant 15 minutes à 25°C avec l'ADN (0,20 nM) dans un tampon Phosphate 10 mM pH 7, 100 mM MnCl_2 . A l'issue de ces 15 minutes d'incubation, 1,5 μ L de Na_2IrCl_6 à 12,5 mM sont ajoutés. Le volume final est égal à 15 μ L. La réaction est stoppée après 15 minutes par ajout d'EDTA. Le traitement pipéridine 1M est réalisé pendant 30 minutes à 90°C. Après une extraction au phénol/chloroforme, les échantillons sont déposés sur un gel PAGE/urée après dénaturation dans le formamide. La migration se fait à 1500 mV dans un tampon Tris-Borate EDTA.

4) *Interaction avec l'ADN*

Le protocole décrit en I.7.b est également utilisé pour l'étude de l'interaction avec l'ADN des mutants PerR-Y60G, PerR-N61G, PerR-R64G, PerR-R67G et PerR-E68G.

V. **Synthèse et détection de la 2-oxo-histidine.**

1) *Synthèse de la 2-oxo-histidine*

Dans un bécher, sous vive agitation (afin de permettre une bonne oxygénation de la solution), à 50 mL d'une solution de N-benzoyl-L-histidine 50 mM sont ajoutés de l'ascorbate 50 mM et du sulfate de cuivre (CuSO_4) à 0,5 mM. Le mélange est placé sous bullage d' O_2 pendant 48 heures. Toutes les 30 minutes pendant les 6 premières heures, le pH est contrôlé et ajusté à pH 7,2 à l'aide d'une solution NaOH 1 M. Le pH est ensuite contrôlé et ajusté toutes les 8 heures.

La N-benzoyl-2-oxo-histidine formée est isolée par HPLC. 1 mL du mélange réactionnel est chargé sur une colonne Hybercarb (Thermo scientific) équilibrée par une solution d'acide acétique 20 mM. Les produits sont élués par une solution d'acide acétique 20 mM à 5 % en acétonitrile et les fractions correspondant aux différents pics sont récupérées. Le suivi de l'élution est réalisé par la mesure de la densité optique à 240 nm. Les différentes fractions sont analysées en spectrométrie de masse. Les fractions contenant la N-benzoyl-2-oxo-histidine (cumul d'une quinzaine d'injections) sont rassemblées et lyophilisées. Le produit est conservé à -20°C avant l'hydrolyse.

La 2-oxo-histidine est préparée par hydrolyse acide de la N-benzoyl-2-oxo-histidine. Le produit lyophilisé est repris dans 100 μL d'acétate d'ammonium 20 mM. L'hydrolyse est réalisée pendant 24 heures à 105°C par une solution d'acide chlorhydrique 6 M en présence de DTT 40 mM. Le mélange réactionnel est ensuite séché sous vide (speed-vac) puis repris dans 1 mL d'une solution d'acétate d'ammonium 20 mM. La 2-oxo-histidine est isolée par HPLC. Le produit d'hydrolyse est chargé sur une colonne uptisphère 5 μODB (Interchrom) équilibrée par une solution d'acide acétique 20 mM. Les produits sont élués par un gradient

de 0 à 60 % d'une solution aqueuse d'acétonitrile à 50%. La 2-oxo-histidine est éluée à 5 % de ce gradient.

La calibration de cet échantillon a été réalisée à l'aide d'une solution de tétrahydrofurane de concentration connue par spectroscopie RMN en calculant le rapport des intégrales des massifs de proton de chaque composé.

2) Détection et quantification par HPLC-MS/MS

La méthode de détection de la 2-oxo-histidine, basée sur la technique HPLC-MS/MS, a été mise au point en collaboration avec Jean-Luc Ravanat du Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques (LAN-CEA Grenoble). Une colonne Hypercarb a été choisie pour la séparation chromatographique. Le tampon de départ est une solution aqueuse à 0,1% d'acide trifluoroacétique et le tampon d'élution correspond à un gradient en acétonitrile. Le dosage est effectué sur un spectromètre de masse API 3000 (Applied biosystems).